

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
NOV 10 '53

EXPERIENTIA



REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE
Lausanne Bern Zürich Genève-Pasadena

Redactor: H. MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG · BASEL 10

SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

L. RUZICKA: The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds 357

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

- H. M. E. CARDWELL and S. SMITH: The Configuration of Digoxigenin 367
L. DORFMAN, C. F. HUEBNER, H. B. MACPHILLAMY, E. SCHLITTLER, and A. F. ST. ANDRÉ: On the Constitution of Reserpine from *Rauwolfia serpentina* Benth 368
K. WIESNER, W. RIDEOUT, and J. A. MANSON: A Note on Geissospermine 369
A. ALBERT: The Affinity of *Iso*-nicotinic Hydrazide for Metals 370
E. VISCHER und A. WETTSTEIN: Mikrobiologische Reaktionen 371
J. J. WEIGLE and R. DULBECCO: Induction of Mutations in Bacteriophage T3 by Ultraviolet Light 372
BALAJI D. MUNDKUR: Interphase Nuclei and Cell Sizes in a Polyploid Series of *Saccharomyces* 373
A. SARACHEK and W. H. LUCKE: Induction of Resistance to X-Ray Inactivation in *Saccharomyces* by Pre-Exposure to 2537 Å Ultra-Violet Radiation 374
S. D. WAINWRIGHT and J. MULLANEY: Some Effects of Metabolic Inhibitors upon Survival of Ultra-Violet Irradiated *Escherichia coli* 376
Mme A. FICQ: Incorporation *in vitro* de glycocolle- $I_{-14}C$ dans les oocytes d'Astéries 377
E. HUSEMANN B. PFANNEMÜLLER und W. HERTLEIN: Über die Ausscheidung und Speicherung von radioaktiv indizierten Xylanschwefelsäureestern 379
R. J. WIEME: La migration de l'hémoglobine additionnée au sérum humain lors de l'électrophorèse sur papier 380
S. BRENNER and A. C. ALLISON: Catalase Inhibition: A Possible Mechanism for the Production of Heinz Bodies in Erythrocytes 381
E. STANGL: Über einen muskelaktiven Wirkstoff aus der Adrenalinreihe (Adrenochrom) 384
MARIANNE BURRI: Zur tierexperimentellen Prüfung eines neuen Lebertotalextraktes 385
S. DIJKGRAAF: Über das Wesen der optomotorischen Reaktionen (II) (Disputandum) 387
L. HIRSZFELD und MARIA GRABOWSKA: Über individuelle Bluteigenschaften (Complementum) 388
DIDA M. CLAUSEN und K. J. RASCH: Zum Verfahren der Radiographie unter Verwendung von Kolloidiumemulsionen (Pro Experimentis) 389

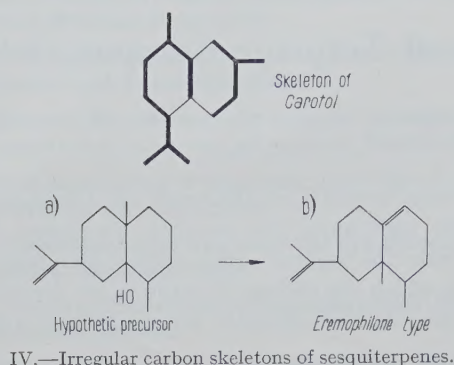
Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

- Gesammelte Mathematische Abhandlungen. Von Ludwig Schläfli, Bd. II (Verlag Birkhäuser AG., Basel 1953) (Ref. A. Ammann) 389
Statistical Method in Biological Assay. By D. J. Finney (Charles Griffin & Co., London, 1952) (Ref. R. Borth) 389
La synthèse protéique. Par Emile F. Terroine (C. N. R. S., Paris 1952) (Ref. K. Bernhard) 390
Comparative Anatomy. By Leverett A. Adams and Samuel Eddy (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1949) (Ref. H. Nüesch) 390
Paul Ehrlich. Von Hans Loewe (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H., Stuttgart 1950) und von Martha Marquardt (Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1951) (Ref. E. Berger) 391

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

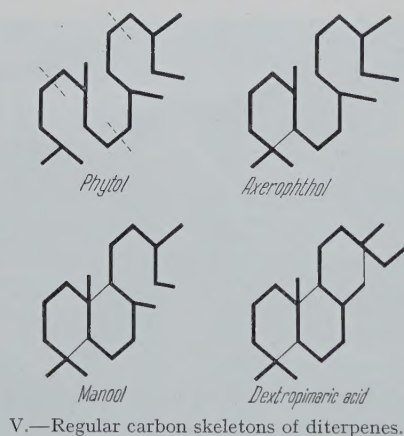
- Theoria: H. HADWIGER: Zur mathematischen Theorie der Gegenstromextraktion 391
In Memoriam FRIEDRICH HERMANN REIN 395

(TREIBS), cedrene¹, β -caryophyllene (ŠORM)², vetivone (PFAU and PLATTNER), and guaial (PLATTNER) can be deduced from farnesol. The wide validity of this structural relationship led to the formulation of the "farnesol rule" which is a special case of the isoprene rule.



Of the sesquiterpenes, only carotol (ŠORM) does not follow the farnesol rule but is instead built of 3 isoprene units in irregular arrangement (IV).

The one exception to the isoprene rule in the sesquiterpene field is eremophilone (IV) (PENFOLD and SIMONSEN). However, according to ROBERT ROBINSON, the carbon skeleton of eremophilone (IVb) may be derived from a eudesmol type precursor (IVa) by migration of a methyl group.



In the *diterpene* group, apart from the carbon skeleton of abietic acid with an irregular sequence of four isoprene units (I), the carbon skeletons of all³ diterpenes (V) are derived from a regular isoprene tetramer con-

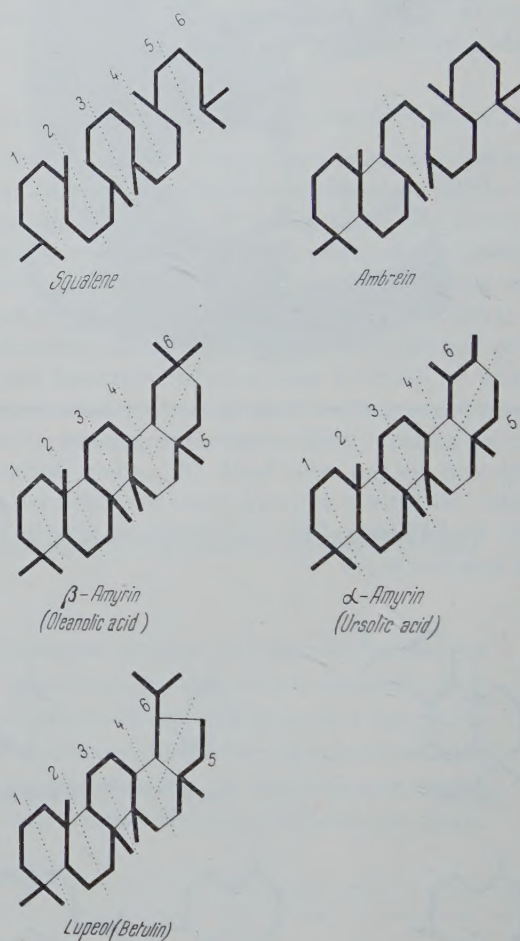
¹ The cedrene formula (III, cf. also XVIII) was proposed by A. ESCHENMOSER in his Ph.D. Thesis, E.T.H., Zurich, 1952. Its correctness was demonstrated experimentally by PLATTNER *et al.* Cf. the paper by PL. A. PLATTNER, XIIIth Internat. Congress of Pure and Applied Chemistry, Stockholm, 29th July, 1953.

² ŠORM was the first to propose a many-membered ring structure for a terpenic compound. The elucidation of the structural details of the caryophyllenes was completed by BARTON, CLEMO, DAWSON, and RAMAGE.

³ α -Camphorene is not considered here, because, though the compound is obtained by dimerisation of myrcene, its structure is not definitely established.

sisting of 4 isoprene units connected head-to-tail. This is best seen in four typical representatives of the diterpenes: the open chain compound phytol (F. G. FISCHER), monocyclic axerophthol (KARRER), bicyclic manool (HOSKING), and tricyclic dextropimaric acid. This structural relationship may be termed the "phytol rule", in analogy to the farnesol rule of the sesquiterpenes.

The majority of the diterpenes derivable from phytol, as for instance sclareol and agathic acid, possess the same bicyclic structure as manool. All bicyclic and tricyclic diterpenes have an identical carbon skeleton in rings A and B. It will be shown that this structural pattern is also present in rings A and B of the triterpenes.

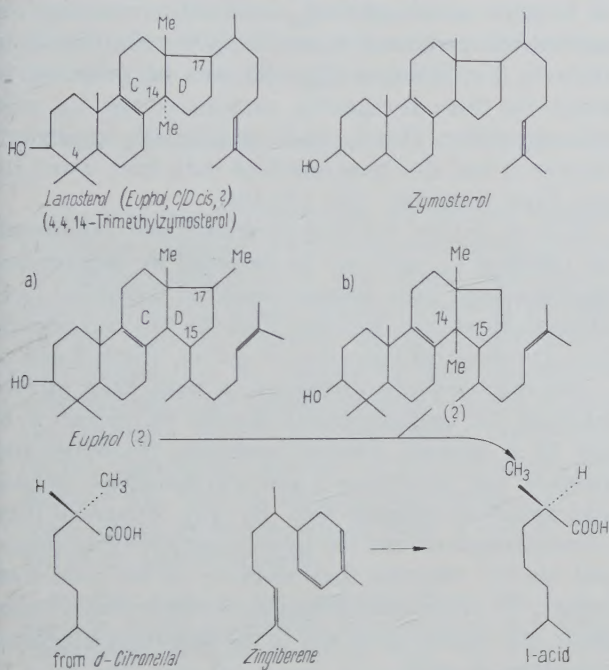


VI.—Symmetrical and irregular carbon skeletons of triterpenes.

The *triterpenes* may be classified on the basis of several structural types. However, a higher analogue of farnesol and of phytol, with a regular head-to-tail arrangement of 6 isoprene units, is not known. A new type is encountered, represented by the aliphatic hydrocarbon squalene (KARRER), which is built of two farnesyl chains symmetrically joined end-to-end (VI).

The symmetrical structure of squalene is reminiscent of the C₄₀ carotenoids, which may be considered, on the basis of their carbon skeleton, as typical representatives of the tetraterpenes.

Only one other triterpene belongs to the squalene type, the tricyclic alcohol ambrein (VI). Both squalene and ambrein are of animal origin. Almost all triterpenes of plant origin, on the other hand, have irregular pentacyclic carbon skeletons (VI) which partially deviate from the squalene type. They may be subdivided in three subgroups, the α -amyrin, the β -amyrin, and the lupeol subgroup. These three fundamental carbon skeletons of the pentacyclic triterpenes differ from each other only in the arrangement of one isoprene unit, which is attached at one end of the molecule (isoprene unit 6 in the formulae). The first four isoprene units (1–4 in the formulae) have the same arrangement as the corresponding units in squalene.

VII¹.—Lanosterol and euphol.

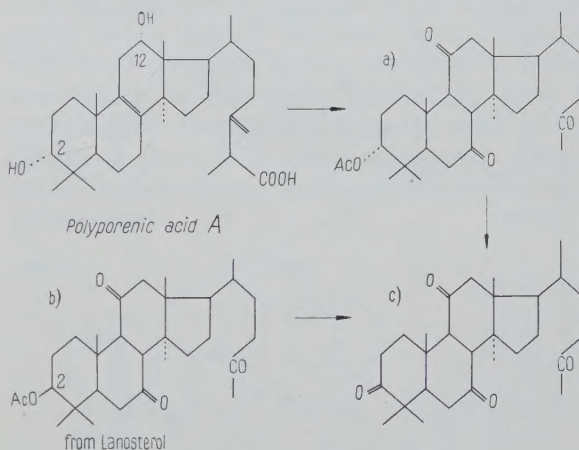
There remains to be mentioned a last group of compounds, which on the basis of their carbon skeleton may be assigned an *intermediate position between the steroids and the triterpenes*. These compounds possess the tetracyclic nucleus typical of the steroids and contain 30 carbon atoms. Two typical representatives of this group are lanosterol and euphol (JEGER).

Lanosterol (VII) was at first assumed to be a triterpene. In the course of degradative studies, however, JEGER found that the carbon skeleton is not built in accordance with the isoprene rule. Lanosterol was therefore defined as the first² representative of the group of the C₃₀ steroids. The relationship between lanosterol and the steroids is evident at first sight, when one compares lanosterol with zymosterol. Lanosterol may in fact be considered a trimethylzymosterol.

Euphol (VII) and lanosterol differ either in the position or in the configuration of the long side chain and of a methyl group in ring *D*. Formula VIIa was originally proposed for euphol, but a structure stereoisomeric with lanosterol, *i.e.* having a *cis* C/*D* junction, is not excluded. For reasons which will be discussed later, formula VIIb should also be considered¹.

One of the latest results in the degradation of euphol should be mentioned here (VII). The 8–9 double bond of dihydroeuphol shifts easily from rings *B/C* into ring *D*. If the euphol formula differs from VIIa, it has to be assumed that one or two methyl groups in ring *D* also migrate. In lanosterol, with a probable *trans*-junction of rings *C* and *D*, such a rearrangement does not occur. If in euphol rings *C* and *D* are *cis*-joined, methyl group migration would perhaps be explainable. The isomerisation product obtained from dihydroeuphol yields a diketone on oxidation. Stepwise degradation of this diketone leads to the dextrorotatory 2,6-dimethylheptanoic acid, which has the L configuration as the corresponding acid deducible from the sesquiterpene zingiberene (VII) and is the antipode of the acid obtained from d-citronellal, for which the *D* configuration is established.

Mention should also be made of *polyporenic acid A* (VIII), because of its close relation to lanosterol. With 31 carbon atoms, polyporenic acid A is something of a curiosity.



VIII.—Relation between polyporenic acid A and lanosterol.

The elucidation of the structure of lanosterol was of decisive assistance in the investigation of polyporenic acid A, and made it possible for HALSALL, JONES, and LEMIN to propose a partial formula. JEGER, HEUSSER, *et al.* have recently succeeded in establishing a *direct experimental relation between polyporenic acid A and lanosterol*. Polyporenic acid A can be converted in several steps to an acetoxytriketone (VIIIa), which was supposed to be closely related to an acetoxydiketone formerly obtained from lanosterol. However, the acetoxytriketone (VIIIb) prepared from this acid differed from the degradation product obtained from polyporenic acid A. The close relationship between the two com-

¹ *Erratum:* In the formulae of the C₉ acids H and CH₃ should be interchanged and I should read d.

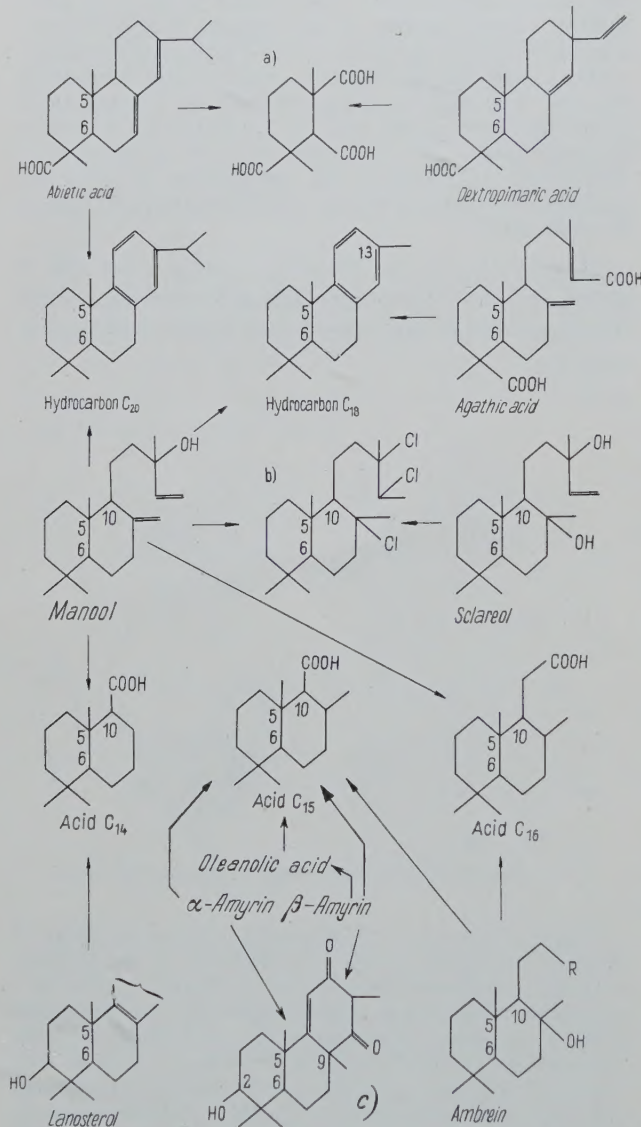
² The second representative is cycloartenol (SPRING; BARTON).

¹ The dehydrogenation of euphadiene with selenium to 1,2,8-trimethylphenanthrene supports the two formulae with the methyl groups in 13 and 14.

pounds was finally established when it was found that both yield the same tetraketone (VIIIc). Since the hydroxyl group of lanosterol in position 3 has β configuration, it is possible to conclude from this result that the corresponding hydroxyl group of polyporenic acid A has α configuration. The configuration of the hydroxyl group in position 12 is according to HALSALL *et al.* also α ¹.

Configurational Correlations in the Diterpene and Triterpene Series

As has been mentioned before, the first two rings of the diterpenes and of the triterpenes have the same structure. It can be shown that these rings also have identical configuration.



IX.—Configurational relationship between diterpenes and triterpenes.

Abietic acid and dextropimaric acid both yield the same C_{11} tricarboxylic acid on oxidative degradation

¹ T. G. HALSALL and E. R. H. JONES in a paper presented at the XIIIth Intern. Congress of Pure and Applied Chemistry, Stockholm, 29th July, 1953, also proposed formula VIII for polyporenic acid A.

(IXa). Manool (JEGER) and abietic acid (CAMPBELL and TODD) have been correlated through transformation into an identical C_{20} hydrocarbon. The relationship between manool and sclareol is established by the fact that both give an identical trihydrochloride (IXb) (HOSKING). Finally manool and agathic acid can both be converted into the same C_{18} hydrocarbon (JEGER).

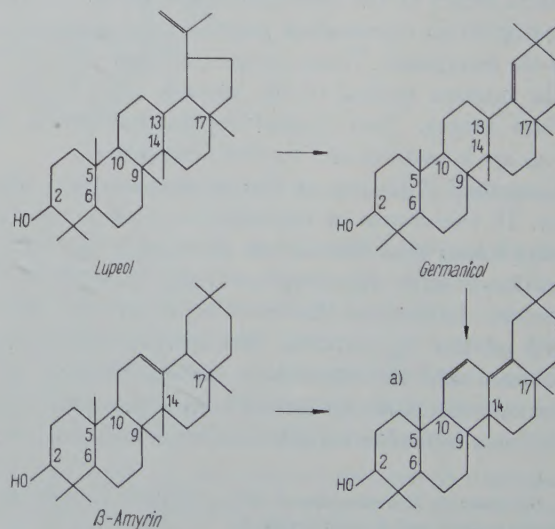
Thus it has been shown that all of these bicyclic and tricyclic diterpenes have the same configuration at the A/B ring junction. This is of course also true of the other diterpenes which have been experimentally correlated with those just discussed.

Manool has also been correlated with the tricyclic triterpene ambrein (JEGER; LEDERER) by degradation of both to an identical C_{16} acid still containing the asymmetric carbons 5, 6, and 10 (IX). Starting from ambrein (LEDERER), a C_{15} acid can be prepared, in which the three asymmetric carbons of the C_{16} acid still are present. This C_{15} acid is particularly important, because it has also been obtained both from α -amyrin and from β -amyrin (IX) (JEGER).

Manool, in turn, has been correlated with lanosterol. An identical C_{14} acid can be prepared by degradative reactions both from manool and from lanosterol (IX) (JEGER; HOSKING), showing that the two compounds have the same configuration at carbon atoms 5 and 6.

The reactions just discussed do more than merely establish the configurational identity of carbons 5, 6, and 10 in manool, sclareol, α -amyrin, β -amyrin, and ambrein, and of carbons 5 and 6 in lanosterol, abietic acid, and dextropimaric acid. By way of manool they connect lanosterol and the amyrins with the diterpenes, and via the amyrins they embrace all the numerous pentacyclic triterpenes, belonging to the α -amyrin subgroup (*e.g.* ursolic acid) and to the β -amyrin subgroup (*e.g.* oleanolic acid).

Within the triterpene group, α -amyrin and β -amyrin have been degraded (JEGER) to an identical tricyclic hydroxydiketone (IXc), thus proving that the two



X.—Relationship between lupeol and β -amyrin.

compounds have the same configuration at carbon atoms 2, 5, 6, and 9. The identity in configuration at position 10 has already been mentioned.

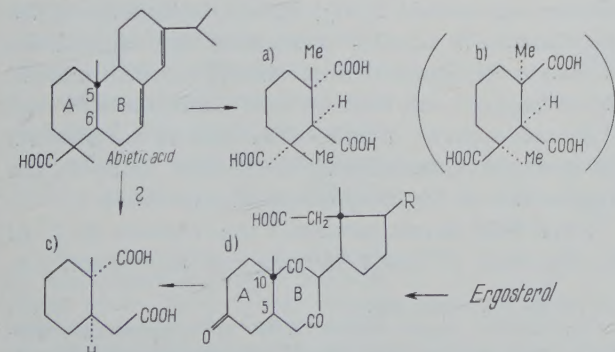
It is mostly through the work of JONES that a third subgroup of the pentacyclic triterpenes, the one of lupeol, has been correlated with β -amyrin (X). JONES obtained germanicol by rearrangement of ring *E* of lupeol. Germanicol itself has been converted (BARTON) into a doubly unsaturated triterpene alcohol (Xa) formerly obtained from β -amyrin (JEGER).

The triterpenes of the β -amyrin subgroup contain 7 asymmetric carbon atoms in positions 2, 5, 6, 9, 10, 14, and 17, which have the same configuration as the corresponding carbon atoms in lupeol (X). Five of these seven asymmetric centers, carbon atoms 2, 5, 6, 9, and 10, have been shown to have the same configuration as in the α -amyrin subgroup (IX).

Relative and absolute Configuration of Diterpenes and Triterpenes

The first evidence regarding the relative configuration in the diterpene and triterpene series was provided for carbon atoms 5 and 6. The already mentioned C_{11} tricarboxylic acid (IXa), which is obtained from abietic acid and from dextropimaric acid, is optically inactive. This means that its asymmetry must be internally compensated. Two configurations (XIa and b) satisfy this condition. By studying the effect of configuration on the dissociation constants of polycarboxylic acids, BARTON was able to assign configuration XIa. As a consequence, *trans*-junction of rings *A* and *B* follows for all di- and triterpenes.

Another proof of the configuration at the *A/B* ring junction would be possible by correlation of a suitable degradation product of abietic acid with one derived from rings *A/B* of a steroid. Starting from ergosterol the dicarboxylic acid XIc has been obtained through the intermediate XIb. The two asymmetric carbon atoms of this acid possess the same configuration as carbons 5 and 10 in cholesterol. The preparation of the corresponding dicarboxylic acid from abietic acid is being carried out in Zürich.



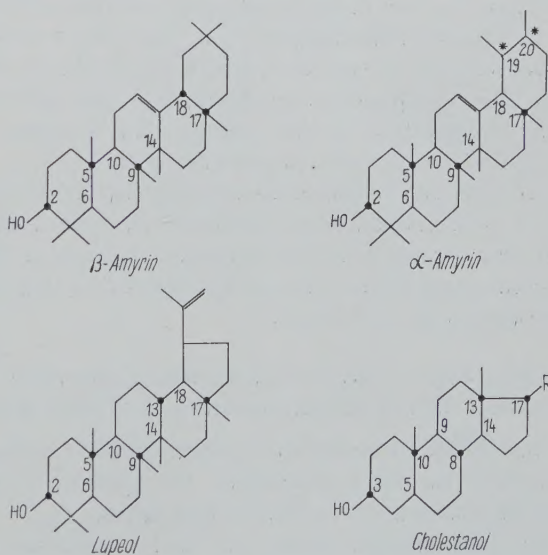
XI.—Steric identity at ring A/B junction in diterpenes, triterpenes and steroids.

It is impossible to report in detail all the fundamental work which has led to an almost complete

elucidation of the stereochemistry of the triterpenes. Our present day knowledge is mainly due to BARTON, CURTIS *et al.*, JEGER, JONES, KLYNE, MILLS, and PRELOG. The methods used are fundamentally the same as those applied in the steroid field and are based on the following studies:

- (1) Studies of the dissociation constants of polycarboxylic acids.
- (2) Studies of the relative stability of stereoisomeric 1,2-condensed ring systems, the question being in each case whether the *trans* or the *cis* configuration is more stable.
- (3) Studies of the possibility of formation of bridged ring systems, in particular of lactones.
- (4) Studies of the steric course of elimination and addition reactions.
- (5) Studies of the contribution of individual asymmetric carbon atoms to the molecular rotation.
- (6) Studies of the molecular structure by X-ray diffraction.
- (7) Studies of the absolute configuration by PRELOG's method using asymmetric synthesis.

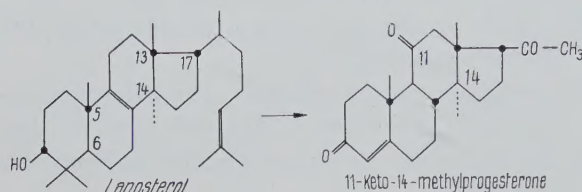
Of these methods, two provide information about the absolute stereochemical configuration: the method of MILLS, based on the contribution of the single asymmetric carbon atoms to the total optical activity, and the method of PRELOG, based on asymmetric synthesis. Combination of the results obtained by these two methods with those achieved by the other methods mentioned above leads to the assignment of the absolute configuration of the asymmetric carbons in the triterpenes.



XII.—Configurational relationship between triterpenes and steroids.

The resulting information regarding the absolute configuration of the triterpenes is presented in the formulae of α -amyrin, β -amyrin, and lupeol (XII). The

configurational formula of cholestanol is also shown for comparison purposes. In the formulae of the three triterpenes the carbon atoms which have β configuration are marked by heavy dots, according to LINSTEAD's notation. All other asymmetric carbons in α -amyrin, β -amyrin, and lupeol have α -configuration, as do the corresponding atoms in cholestanol. The carbons 19 and 20 in α -amyrin are of unknown configuration and are marked by asterisks in the formula. In the case of lupeol (and of β -amyranol) there are 7 asymmetric carbons (2, 5, 6, 9, 10, 13, and 14) having the same configuration as the corresponding carbons in cholestanol, while in the case of α - and β -amyrin there are 6 (carbons 2, 5, 6, 9, 10, and 14).



XIII.—Hormone from lanosterol.

Lanosterol has been shown to have the same absolute configuration at the A/B ring-junction as the triterpenes and cholestanol. Mention should also be made of a tentative deduction of the configuration of carbon atoms 13, 14, and 17 from physiological properties (JEGGER). A compound prepared starting from lanosterol, 11-keto-14-methylprogesterone (XIII), has been found to have the same qualitative and quantitative activity in the CORNER-ALLEN test as 11-keto-progesterone. It is a well known fact that the hormonal activity of progesterone is highly dependent on configuration, and it may be deduced from the activity of 11-keto-14-methylprogesterone that the 4 asymmetric carbons of lanosterol, which are present in 11-keto-14-methylprogesterone (XIII), have probably the same configuration as the corresponding 4 atoms in progesterone, and consequently in cholestanol.

The same conclusion has been reached by CURTIS *et al.* by X-ray diffraction study of lanosterol. CURTIS' results lead him to assign to the lanosterol molecule a flat structure, analogous to the one established by BERNAL 20 years ago for cholestanol.

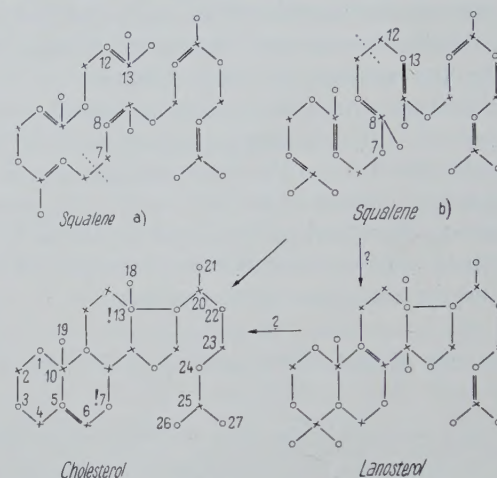
Biogenesis of Steroids and Terpenic Compounds (together with A. ESCHENMOSER¹ and H. HEUSSER)

Once the structure and the configuration of a natural compound has been established, the question arises how the compound is synthesized in nature.

The first definite answer to such a question in regard to the carbon skeleton of the steroids and the triterpenes was given by BLOCH through a biological synthesis of cholesterol from acetic acid labelled with

¹ Cf. A. ESCHENMOSER, Ph.-D. Thesis, E.T.H., Zurich, 1952, p. 16-38.

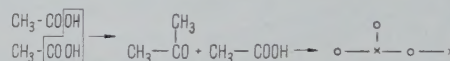
C¹⁴. BLOCH has also provided evidence indicating that in all probability squalene is an intermediate in this synthesis. The two ways by which squalene may be transformed into cholesterol, are shown in schemes XIV *a* and XIV *b*. Scheme *a* represents the cyclisation of squalene as proposed by ROBINSON. Scheme *b* is the mechanism proposed by WOODWARD and BLOCH.



XIV.—Biogenesis of cholesterol and lanosterol from squalene.

O = Carbon from acetate methyl,
X = Carbon from acetate carboxyl.

In both schemes the carbon atoms originating from the methyl group of acetic acid are indicated by a small circle, and those originating from the carboxyl group of acetic acid by a cross, in accordance with the arrangement of the isoprene units in squalene (VI) and with the formation of the isoprene skeleton from acetic acid (XV).



XV.—Distribution of acetate carbons in the biogenesis of the isoprene skeleton.

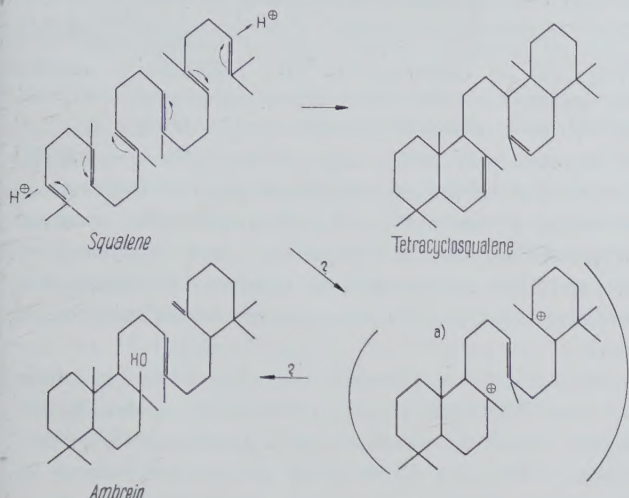
Comparison of the two schemes XIV *a* and *b* shows that the cholesterol carbons at positions 7, 8, 12, and 13 are derived from different acetate carbons, depending on whether scheme *a* or scheme *b* is followed. An experimental decision between these two cyclisation schemes was reached by appropriate degradation of the biosynthetically labelled cholesterol. By degradation of cholesterol obtained from methyl labelled acetate, BLOCH has been able to prove that carbon atoms 7¹ and 13 are radioactive². It follows that scheme *b* represents the cyclisation mechanism, if squalene really is the intermediate in the biosynthesis of cholesterol.

It had been shown previously that carbons 20-27 of the side chain (WÜRSCH, HUANG, and BLOCH) and 1-6,

¹ Private communication.

² A. MONDON, *Angew. Chemie* 65, 333 (1953), has recently published a paper in which he proposes a hypothetical iso-squalene as the biological precursor of cholesterol. In this hypothesis the rearrangement required in the deduction of the cholesterol formula from squalene is avoided. However, MONDON's proposal is in disagreement with BLOCH's experimental results, as it does not account for the presence of a carbon atom derived from an acetate methyl group in position 13 of cholesterol.

10, and 19 of rings *A/B* of cholesterol (HUNTER, POPJAK, and CORNFORTH) are arranged according to the



XVI.—Acid-catalysed cyclisation of squalene.

alternation principle required by both cyclisation schemes (XIV).

Though squalene most probably is the biological precursor of cholesterol, it should be emphasised that the only product obtained so far by acid-catalysed cyclisation of squalene is tetracyclosqualene¹ (XVI). It can be assumed that also ambrein is formed by cyclisation of squalene. In the formation of tetracyclosqualene, as well as in that of ambrein, cyclisation starts simultaneously at both ends of the squalene molecule (XVI).

An essential characteristic of the biological cyclisation of squalene to the steroids is the attack of a cation (e.g. OH^+) at one end only of squalene (XVII)², whereupon the cyclisation proceeds synchronously to completion³. In the case of *lanosterol*, *zymosterol*, and *cholesterol*, the cyclisation yields (by way of the intermediates XVII *a* and *b*) the cation XVII *c*,

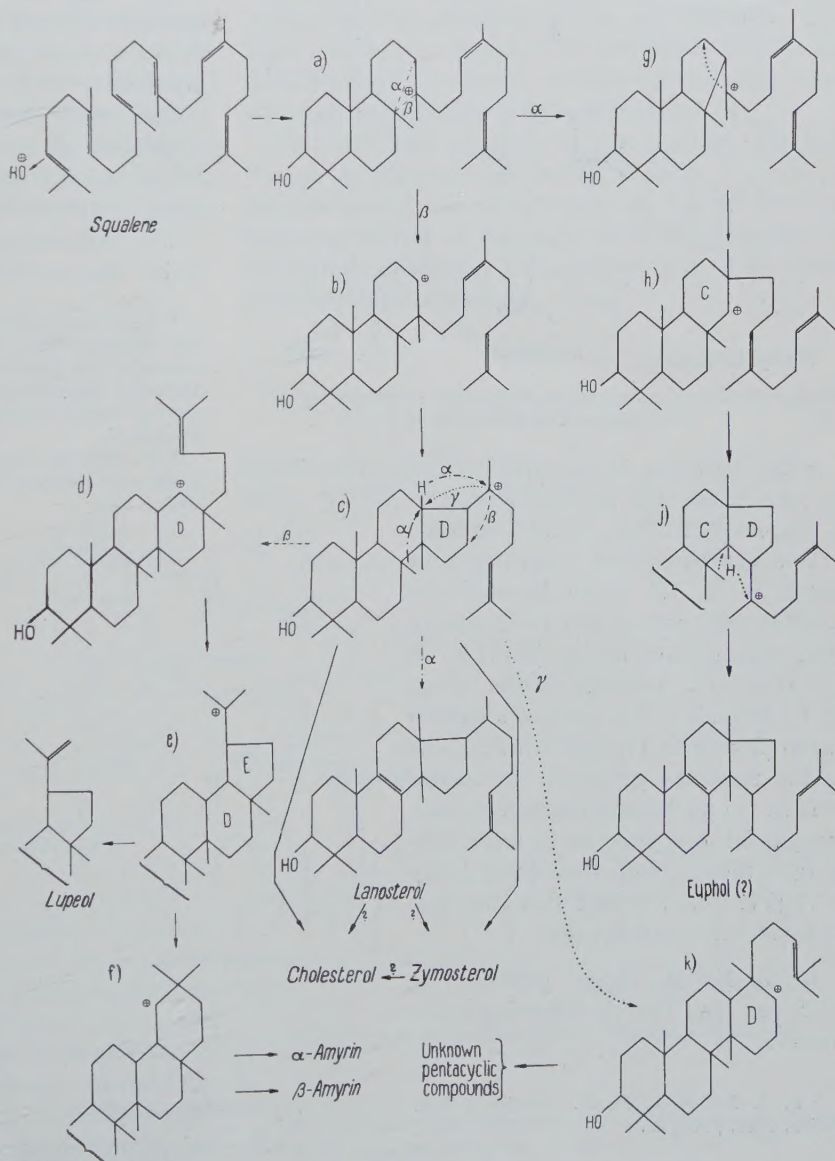
which is stabilised (reaction α in XVII *c*) through a 1–3 hydrogen shift¹ (from position 13 to position 20) and a double 1–2 methyl shift² (positions 8, 14, and 13).

The cation XVII *c* could also be stabilised by WAGNER-MEERWEIN rearrangement, and this by two different routes (routes β and γ in XVII *c*) each leading to different pentacyclic systems. Both rearrangements result in the enlargement of ring *D* to a 6-membered ring (XVII *d* and *k*).

The cation XVII *d* leads to the formation of a 5-membered *E*-ring (XVII *e*), and hence to *lupeol*. A further WAGNER-MEERWEIN rearrangement of XVII *e* leads by way of the intermediate XVII *f* to α -*amyrin* and β -*amyrin*. This route from *lupeol* to β -*amyrin* via the intermediates XVII *e* and XVII *f* is nothing but a formulation of the well-known transformation of *lupeol* into compounds of the β -*amyrin* type, which, as we have seen, has been experimentally achieved (X).

¹ Or a double 1–2 shift.

² Or a 1–3 shift.



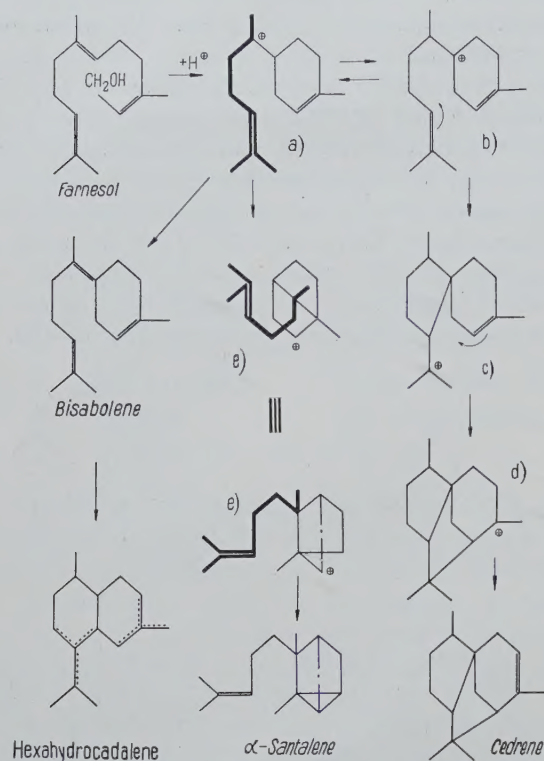
XVII.—Ionic mechanisms in the biogenesis of steroids and triterpenes from squalene.

¹ The position of the two double bonds in tetracyclosqualene, which has been proved by G. BÜCHER (private communication), explains why further cyclisation of tetracyclosqualene has so far been impossible.

² In Table XVII, for the sake of simplicity, the configuration of the methyl groups is not indicated.

³ It is not known at what stage the methyl groups in positions 4 and 14 may be eliminated.

The cation XVII*k*, on the other hand, represents the precursor of pentacyclic compounds of structural types, which so far have not been observed in nature. It is worth noting that ring *E* in these hypothetical compounds would have structures similar to those of ring *E* in lupeol, α -amyrin, and β -amyrin.



XVIII.—Ionic mechanisms in the biogenesis of sesquiterpenes (6-membered ring intermediate).

A last variation of the squalene cyclisation should be mentioned. The limiting structure XVII*g* of the π -complex XVII*a* could undergo a WAGNER-MEERWEIN rearrangement (from 14 to 12) to an intermediate XVII*h*, with subsequent formation of the five-membered *D*-ring (XVII*j*). A 1-3 shift of a hydrogen atom (from 14 to 20) and a 1-2 shift of a methyl group (from 8 to 14) would lead to one of the formulae proposed for *euphol* (VII*b*). On the basis of this mechanism, formula VII*b* appears to be more likely than the one with the methyl group in 17 (VII*a*) and should therefore also be taken into consideration.

In an E.T.H. thesis¹ published in 1925, one may find the following statements:

¹ E. A. RUDOLPH, Ph.-D. Thesis, E.T.H., Zürich, 1925, p. 98, 99.

"The hypothesis may be formulated that the steroids and the triterpenes have, at least partially, a common origin. For instance, one only has to insert a methyl group in each of the rings *A*, *B*, and *C* of cholesterol, in order to obtain a carbon skeleton corresponding to a triterpene. It would not be very profitable to discuss the question whether steroids may originate from such triterpenes by elimination of three methyl groups.¹"

28 years later, in the light of BLOCH's experimental results and of the constitutional and configurational relations of steroids and triterpenes, the common origin of steroids and triterpenes is not only a matter of profitable discussion, but achieves the status of a working hypothesis for future chemical and biochemical work.

It should be emphasized that all of the biogenetic schemes discussed above are based on generally accepted reaction mechanisms. Analogous biogenetic schemes² can also be proposed for the biosynthesis of sesquiterpenes, diterpenes, and monoterpenes.

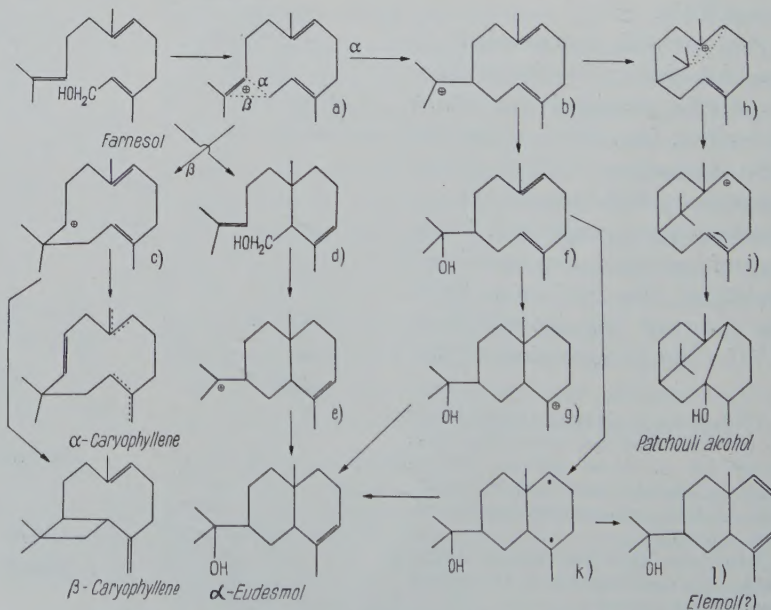
The biogenesis of sesquiterpenes possessing a carbon skeleton derived from farnesol may be assumed to follow a route starting from farnesol, farnesene or nerolidol.

One may distinguish two types of biogenetic cyclisation of farnesol. One is characterised by the formation of 6-membered ring intermediates and the other of 10- or 11-membered ring intermediates.

The acid-catalysed cyclisation of farnesol or nerolidol, which was carried out experimentally in Zurich in

¹ The cholesterol formula which had been proposed by WIELAND and WINDAUS when this Thesis was written was far from being established and no triterpene formula at all had as yet been published. The above biogenetic hypothesis was advanced on principle, because it appeared more likely than the one deriving the steroids from fatty acids (WIELAND).

² For the sake of greater clarity, the hypothetical intermediates in the acid-catalysed cyclisations are formulated as classical carbenium ions.



XIX.—Ionic and radical mechanisms in the biogenesis of sesquiterpenes (10- and 11-membered ring intermediates).

1925, is an example of the first type. By way of the intermediate 6-membered ring cation XVIIIa, the reaction leads to *bisabolene* and further to a mixture of hexahydrocadalenes. The intermediate XVIIIa could undergo a different cyclisation leading to the cation XVIIIe, in analogy to the schematic transition from XXIIa to the bornyl cation (XXIIb). The cation XVIIIe would be stabilised to α - or to β -*santalene*. The cation XVIIIb, also derived by cyclisation of farnesol, leads to *cedrene* by way of the intermediates *c* and *d*.

The second type of farnesol cyclisation starts from the π -complex XIXa of the farnesyl cation, and may lead to a cation with a 10-membered ring (*b*) or to a cation with an 11-membered ring (*c*). The intermediate *c* yields α -*caryophyllene* (humulene) directly, or else, on formation of a 4-membered ring, β - or γ -*caryophyllene*.

The 10-membered ring intermediate XIXb, which is derived from the π -complex of the farnesyl cation, leads to *patchouli alcohol* by way of the π -complex XIXh and the bicyclic intermediate XIXj.

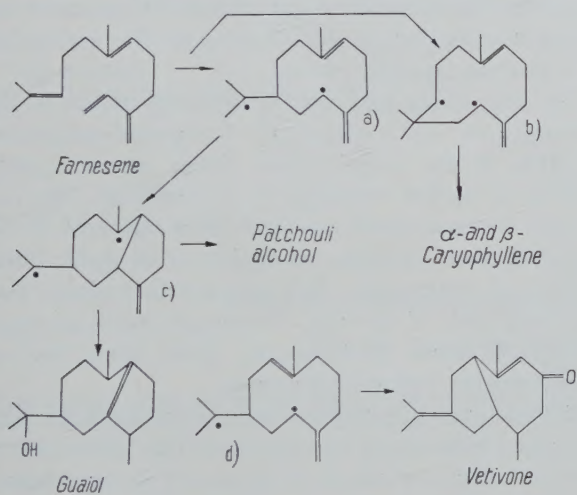
The biogenesis of *eudesmol* may be formulated along two different ionic routes. The one leads to α - or β -*eudesmol* by way of the already mentioned 10-membered ring intermediate XIXb and the intermediates *f* and *g*. The other route starts with a cyclogeraniol type cyclisation of farnesol to an intermediate XIXd, followed by an α -terpineol type cyclisation (XIXe) to α -*eudesmol*.

radical *c* of the guaiol type. From here stabilisation may take place either directly to *guaiol* or by further cyclisation to *patchouli alcohol* (formula in Table XIX). The intermediate on the way from farnesene to the caryophyllenes (formulae in Table XIX) is the biradical XXb. A shift of the ring double bond of the biradical XXa would lead to a new 10-membered ring biradical (XXd), which may be stabilised by cyclisation, yielding *vetivone*.

Formula XIXl, recently advanced for *elemol* by ŠORM¹, on the basis of the isolation of methyl-diisopropylbenzene on dehydrogenation, may be derived from the intermediate XIXf by cyclisation to the biradical XIXk, which could then undergo ring opening. This ring opening to XIXl corresponds closely to the one that occurs in the experimental conversion of α -pinene into ocimene (or *allo*-ocimene) and of β -pinene into myrcene by way of the biradicals XXIIIa and XXIIIb.

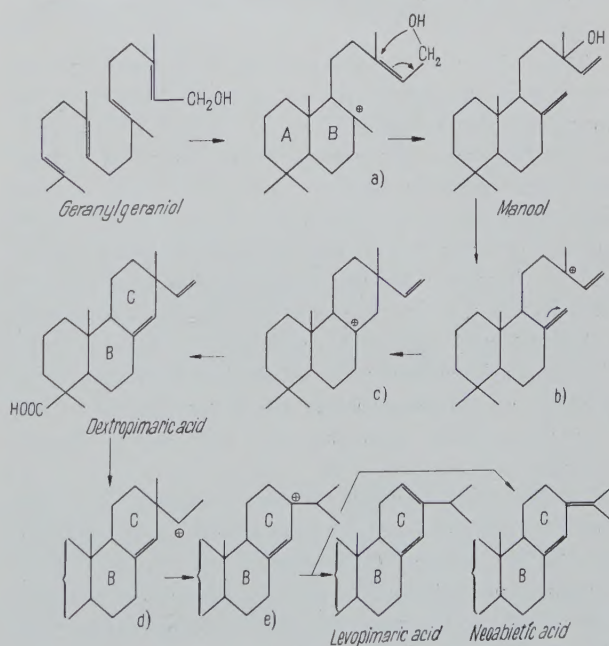
Another stabilisation route of the biradical XIXk would lead to α -*eudesmol*. This stabilisation is analogous to the conversion of the biradicals XXIIIa and XXIIIb into limonene, which has actually been obtained by pyrolysis of α - and β -pinene.

Farnesol thus occupies a key position not only because it possesses the carbon skeleton traceable in sesquiterpenes, but also because it is a possible biological precursor of the cyclic sesquiterpenes and, in the form of difarnesyl (*i.e.* squalene), also of the triterpenes and of the steroids.



XX.—Radical mechanisms in the biogenesis of sesquiterpenes (10- and 11-membered ring intermediates).

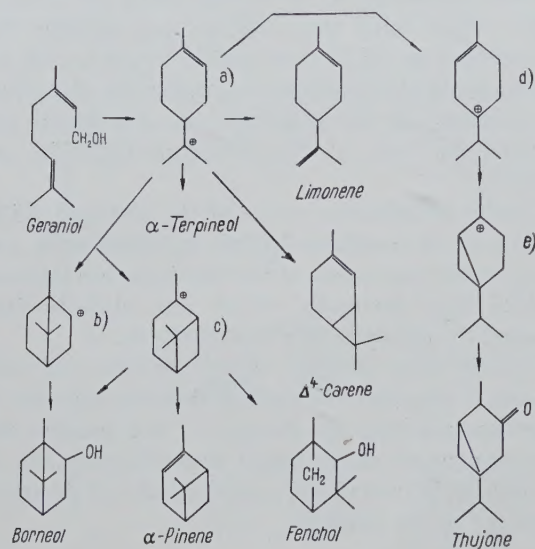
So far only ionic cyclisations have been discussed. *Radical mechanisms* may, however, also be involved (XX). In fact, in certain cases the radical mechanism may be more appropriate than the ionic one, as for instance in the cyclisation of farnesene to guaiol, to vetivone, and also to the caryophyllenes. In the case of guaiol the intermediate would be the monocyclic biradical XXa which can cyclise to the bicyclic bi-



XXI.—Ionic mechanisms in the biogenesis of diterpenes.

¹ F. ŠORM in a paper presented at the XIIIth Internat. Congress of Pure and Applied Chemistry, Stockholm, 29th July, 1953.

The *diterpenes* can easily be derived from geranylgeraniol¹, which so far has not been found in nature. Double cyclisation at one end of the molecule, accompanied by an allylic rearrangement at the other end (XXIa), would lead to *sclareol* and *manool*. Manool could in turn yield *dextropimaric acid* by cyclisation of the intermediate XXIb to XXIc. From dextropimaric acid, finally, one may derive *neoabietic acid* and *levopimaric acid*, by way of a WAGNER-MEERWEIN rearrangement of the intermediate XXIc to XXIe. As is well known, neoabietic acid and levopimaric acid readily yield *abietic acid*.

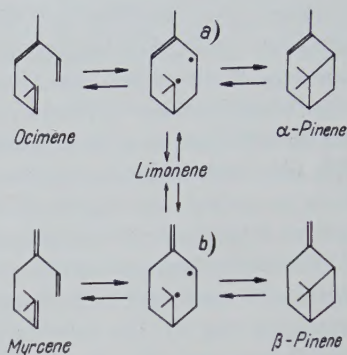


XXII.—Ionic mechanisms in the biogenesis of monoterpenes.

The cyclic *monoterpenes* can also be derived from an open chain precursor such as geraniol² by way of the common intermediate XXIIa. In Table XXII the well-known formation of *limonene* from geraniol is formulated. The intermediate *a* can cyclise to XXIIb or c and lead either to α - and β -pinene, or to borneol. From pinene, by way of XXIIc bornyl and fenchyl derivatives can be obtained. By an intramolecular electrophilic substitution the intermediate XXIIa can also lead to a 3-membered ring and consequently to Δ^4 -carene. Thujone and sabinene may be derived from the cation XXIIc, an intermediate in the formation of α - and γ -terpinene from limonene, by way of the bicyclic cation e.

For the biogenesis of the monoterpenes it is also possible to propose radical mechanisms, as for example for the formation of limonene and α -pinene from ocimene, and of limonene and β -pinene from myrcene, by way of the intermediate biradicals XXIIIa and b. The reactions in Table XXIII are nothing but the reversal of the experimentally achieved thermal ring

openings of α -pinene to yield limonene and *allo-ocimene* (which is formed by isomerisation of the



XXIII.—Radical mechanisms in the biogenesis of monoterpenes.

primary product ocimene), and of β -pinene to yield limonene and myrcene.

Isoprene rule

Only few of the cyclisations mentioned above have been carried out in the laboratory. These reactions can follow various routes, each leading to different natural compounds and, so far, most of the routes are, on steric grounds, not accessible *in vitro*. The course of a cyclisation is not only dependent on the reaction mechanism, but also to a high degree on the *constellation*¹ of the precursor and of the intermediate. It is an important function of the enzymes to bring about the required constellation and thus cause the cyclisation to follow one specific course.

An interesting example of the importance of the constellation in the biogenesis of terpenic compounds is given in the sesquiterpene group, where a great variety of carbon skeletons is encountered. The one carbon skeleton which has never been observed, is the bicycloparnesol skeleton, so typical of all cyclic diterpenes and triterpenes. This appears to indicate that the biogenesis of steroids, diterpenes, and triterpenes differs in some fundamental detail from that of monoterpenes and sesquiterpenes.

Whether the hypothetical schemes which have been discussed have a real significance in the laboratory of nature, remains of course to be proved by experiment. BLOCH's merit is to have provided a firmer basis for such an experimental approach to the biogenesis of terpenic compounds as well as of the steroids.

Moreover, the deduction of structures of natural terpenic compounds by accepted reaction mechanisms from the hypothesized simple precursors squalene, geranylgeraniol, farnesol, geraniol ("biogenetic isoprene rule") not only serves to outline possible biogenetic routes,

¹ Or from analogous compounds which can yield suitable ionic or radical intermediates, e.g. geranyllinalool, geranylmyrcene.

² Or from analogous compounds, e.g. linalool, myrcene.

¹ The word "constellation" (F. EBEL in K. FREUDENBERG, Stereochemie [F. Deuticke, Leipzig and Wien, 1933], p. 825) has the same meaning as "conformation" (cf. D. H. R. BARTON, Soc. 1953, 1027).

but also represents a new helpful tool in the structural elucidation of terpenic compounds. This new tool limits the number of carbon skeletons which can be proposed on the basis of the original isoprene rule¹ ("empirical isoprene rule") alone. It is obvious that any formula deduced in accordance with the "biogenetic" as well as with the "empirical" isoprene rule requires experimental proof.

The "empirical isoprene rule" was deduced formally from the structure of the natural terpenic compounds. From the "biogenetic isoprene rule", however, it would follow that the carbon skeleton of the biological end product is not necessarily identical to the carbon skeleton of the precursor. In other words the validity of the "empirical isoprene rule" depends on the mechanisms of formation of the natural compounds, and the failure of a terpene to obey this rule does not necessarily disprove its origin from isoprene units.

Nomenclature

The terms terpene, diterpene, triterpene are retained here in preference to the terms terpenoid, diterpenoid, triterpenoid, which are occasionally used in the modern literature. These terms have unnecessarily been introduced in analogy to the expression "steroid", which denotes a group of compounds having an irregularly varying number of carbon atoms. In the terpenic field the expression terpenoid should be reserved by analogy for compounds in which the number of carbon atoms varies irregularly², in contrast

to the terpenes proper, where the number of carbon atoms is always a multiple of five.

The terms monoterpene, sesquiterpene, diterpene, triterpene are unambiguous and need not be replaced by nebulous synonyms ending in "oid". The term terpene, on the other hand, originally designated the monoterpenes alone. In order to avoid confusion the term terpene should be used only to designate the whole class of the terpenic compounds, and for the C₁₀ group the term monoterpene should be used exclusively.

Zusammenfassung

Es wird eine Übersicht über die Kohlenstoffgerüste der Sesquiterpene, Diterpene und Triterpene gegeben. Die Isoprenregel zeigt in jeder dieser Gruppen besondere Eigenheiten. Auch die C₃₀-Steroide und ein Steroid mit 31 Kohlenstoffatomen, die mit den Triterpenen verwandt sind, werden besprochen. Die Zusammenhänge zwischen Diterpenen und Triterpenen in bezug auf ihre Konstitution und Konfiguration werden diskutiert, wobei auf die weitgehende Übereinstimmung ihrer Konfiguration mit der Konfiguration der Steroide hingewiesen wird. Die kürzlich durch die Experimentalarbeiten von BLOCH gewonnenen Kenntnisse über die biologische Entstehung des Cholesterins aus Essigsäure, unter sehr wahrscheinlicher Zwischenbildung des Triterpens Squalen, geben Anlass zur Erörterung hypothetischer Wege für die Biogenese der pentazyklischen Triterpene aus Squalen, der zyklischen Sesquiterpene aus Farnesol, der zyklischen Diterpene aus Geranyl-geraniol und schliesslich auch der zyklischen Monoterpene aus Geraniol, unter Beachtung der elektronischen Zyklisierungsmechanismen der organischen Chemie. Schliesslich wird die «biogenetische» Isoprenregel definiert und ihre Bedeutung diskutiert.

¹ Cf. page 357.

² E.g. *santene* (C₉), *irone* (C₁₄), *lupulone* (C₂₁).

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

The Configuration of Digoxigenin

Although crystalline Digoxin (the tridigitoxoside of digoxigenin) was isolated in 1930¹ and has been in clinical use in the United Kingdom since 1933² the accepted proof of its structure is vitiated by a discrepancy between the optical rotation of the derived methyl 3:12-dihydroxyetianate, $[\alpha]_D + 39^\circ$ (methanol)³ and of authentic methyl 3 α :12 β -dihydroxyetianate, $[\alpha]_D + 52^\circ$

(methanol)¹, with which it gave no melting point depression². This matter was discussed with Professor REICHSTEIN and Dr. D. A. H. TAYLOR in 1952 and in the knowledge that the former was planning to prepare the four isomeric 3:12-dihydroxyetianates and the latter was repeating the degradation of digoxigenin, we studied partial acetylation of digoxigenin and the anhydrodigoxigenins.

¹ V. WENNER and T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **27**, 965 (1944).

² M. STEIGER and T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **21**, 828 (1938). - H. L. MASON and W. M. HOEHN, *J. Amer. Chem. Soc.* **60**, 2824 (1938); **61**, 1614 (1939).

¹ S. SMITH, *J. Chem. Soc.* 1930, 508.

² *Brit. Med. J.* **295**, 364 (1933).

³ M. STEIGER and T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **21**, 828 (1938).

Digoxigenin on attempted partial acetylation gave mixtures of the diacetate and digoxigenin with no trace of monoacetates. " β "-Anhydro (Δ 14) digoxigenin however gave the 12-monoacetate, m.p. 199° $[\alpha]_D + 26^\circ$ (chloroform), whilst " α "-anhydro(Δ 8-14)digoxigenin gave a complex mixture from which a little of the 3-monoacetate, m.p. 218° $[\alpha]_D + 31^\circ$ (chloroform) was isolated. The derived molecular increments of rotation on acetylation of the 3-hydroxy group were $+28$ and -15 respectively, and clearly support a 3β -configuration (standard value $+17 \pm 17$) rather than a 3α -configuration (standard value $+83 \pm 30$)¹. In addition, " α "-anhydrodigoxigenin-3-monoacetate shows a complex band in the infra-red at $8\ \mu$, characteristic of a 3β -acetoxycholane derivative². The formulation of digoxigenin as $3\beta:12\beta:14$ -trihydroxycard-20:22-enolide with a 3β -" α "-hydroxy group and a 12β -" α "-hydroxy group which is hindered by the 14β -hydroxy group satisfactorily explains the partial acetylation experiments.

Digoxigenin, therefore, like all known cardiac aglycones of proved chemical structure, has a 3β -hydroxy group.

H. M. E. CARDWELL and S. SMITH

The Dyson Perrins Laboratory, Oxford University, and Dartford, Kent, 10 June, 1953.

Zusammenfassung

Partielle Azetylierung von Digoxigenin und den Anhydrodigoxigeninen hat ergeben, dass dem Digoxigenin die Struktur 3β ; 12β , 14 -Trihydroxy-card 20 (22)-enolid zukommt.

¹ D. H. R. BARTON, J. Chem. Soc. 1946, 1116.

² R. N. JONES, P. HUMPHRIES, F. HERLING, and K. DOBRINER, J. Amer. Chem. Soc. 73, 3215 (1951).

On the Constitution of Reserpine from *Rauwolfia serpentina* Benth¹

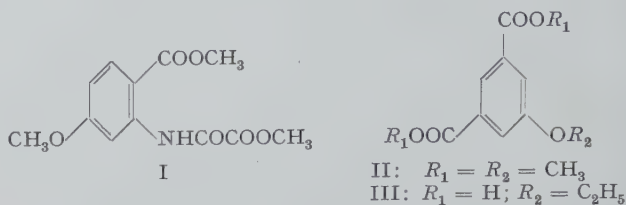
In an earlier communication² we have demonstrated that reserpine³, a hypnotic and hypotensive alkaloid, isolated from *Rauwolfia serpentina* BENTH⁴, can be hydrolyzed to reserpic acid, trimethoxybenzoic acid and methanol.



The original alkaloid could be reconstituted by the interaction of methylreserpate with trimethoxybenzoylchloride in pyridine solution and it was thus demonstrated that reserpic acid, the key-compound in the chemistry of reserpine, does not suffer from any secondary changes during hydrolysis.

Oxidation of reserpic acid with potassium permanganate under conditions used in the indole alkaloid field by earlier investigators⁵ has yielded 4-methoxy-oxalyl-

anthranilic acid (isolated as its ester I). By potash fusion we have obtained an acidic fraction, which, after methylation, yielded the symmetric 5-methoxyisophthalic acid dimethyl ester (II). Both compounds were identical with synthetic products¹; their I.R. spectra were identical and no depression of mixed melting point was found.



As it was possible that the methoxyl group of the ester (II), was an artefact, the acidic fraction of the potash fusion was ethylated with diazoethane. The crude ester was a liquid at room temperature, crystallizing at -20° . It was therefore hydrolyzed and 5-ethoxyisophthalic acid (III), identical with a synthetic product, was obtained. It was thus demonstrated that 5-hydroxyisophthalic acid was present originally. This does not necessarily imply that the phenolic hydroxyl of the isophthalic acid represents the alcoholic group of reserpic acid, but for biogenetical reasons it is quite likely.

When reserpic acid hydrochloride was treated with acetic anhydride in pyridine, a lactone, $C_{22}H_{26}O_4N_2$, m.p. 335° could be obtained in 60% yield, which was best isolated as a hydrochloride. The same compound was obtained with acylchlorides generally, but the isolation of the pure compound, in this case, was more difficult. The presence of a γ -lactone is supported by I.R. evidence, which would fit into our conceptions concerning the positions of the carboxyl and the alcoholic hydroxyl groups. Spectral evidence indicates that reserpic acid contains a monomethoxylated tetrahydro- β -carboline system. This assumption is further substantiated by a positive ADAMKIEWICZ color test, which is not, as stated in the literature², typical for a carboxylic acid of the harman series, but for tetrahydroharman derivatives themselves. This color reaction has been studied with more than 20 indole alkaloids and found to be correct in all cases³.

Furthermore, the isolation of the isophthalic acid derivative makes it likely that reserpic acid is a derivative of yohimbane⁴. For the time being, we postulate this working hypothesis and if this is accepted, it is evident that acid (I) is derived from rings A and B and acid (II) from ring E of the yohimbane skeleton. Although full experimental information concerning rings C and D is not yet available, we propose the following structure for reserpic acid (IV)⁵.

¹ K. WARNAT, Helv. chim. Acta 14, 997 (1931). – J. CALANDRA and J. SVARZ, J. Amer. Chem. Soc. 72, 1027 (1950).

² D. G. HARVEY, E. J. MILLER, and W. ROBSON, J. Chem. Soc. 1941, 153.

³ We are indebted to Drs. F. BADER and J. MÜLLER of Ciba, Basle, for this information.

⁴ J. YOST, Helv. chim. Acta 32, 1297 (1949).

⁵ Numbering according to BARGER-SCHOLZ, Helv. chim. Acta 16, 1343 (1933).

Note added in proof: From the products of selenium dehydrogenation of reserpic acid methylester yobyryne and a substance $C_{19}H_{16}N_2O$ (Mp. 266°), probably 7-hydroxy-yobyryne, were isolated, affording more evidence for the presence in reserpine of the yohimbane skeleton. Compare communication to J. Amer. Chem. Soc. by A. F. ST-ANDRÉ *et al.* and R. SCHWYZER.

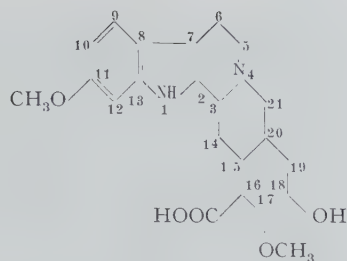
¹ Communication 7 on *Rauwolfia* Alkaloids.

² A. FURLENMEIER, R. LUCAS, H. B. MACPHILLAMY, J. M. MÜLLER, and E. SCHLITTLER, Exper. 9, 331 (1953).

³ Ciba's trade name for reserpine is "Serpasil".

⁴ J. M. MÜLLER, E. SCHLITTLER, and H. J. BEIN, Exper. 8, 338 (1952).

⁵ E. SPÄTH and H. BRETSCHNEIDER, Ber. dtsch. chem. Ges. 63, 2997 (1930). – M. M. JANOT, R. GOUTAREL, and R. SNEEDEN, Helv. chim. Acta 34, 1205 (1951).



Details of our experimental work will be published elsewhere.

L. DORFMAN, C. F. HUEBNER,
H. B. MACPHILLAMY, E. SCHLITTLER,
and A. F. ST. ANDRÉ

Research Laboratories of Ciba Pharmaceutical Products, Inc., Summit, New Jersey, July 24, 1953.

Zusammenfassung

Bei der Permanganatoxydation und der Kalischmelze der Reserpinsäure wurden 4-Methoxy-oxalylanthranilsäure und 5-Oxyisophtalsäure isoliert. Als Arbeits-hypothese wird deshalb für Reserpinsäure eine Yohimbanstruktur postuliert. Durch die obigen Abbauergebnisse ist die Stellung der einen Methoxylgruppe festgelegt, wogegen die Haftstellen der drei weiteren funktionellen Gruppen noch nicht gesichert sind.

A Note on Geissospermine

Some time ago we had the opportunity to investigate a limited amount of geissospermine. As our results do not quite agree with those reported in the literature, and as we do not anticipate a possibility to carry on this work, we report briefly our main findings. We have isolated geissospermine by the method of BERTHO and MOOG¹. However, the amorphous product obtained this way failed to crystallize and was purified by chromatography on alumina. Geissospermine was eluted by ether-chloroform 1:1 and all the fractions crystallized easily from alcohol. After 8 crystallizations from ethyl acetate geissospermine melted at 217–219°. This compound is not a sesquihydrate as reported by BERTHO² (reported m.p. 210–212°) but is anhydrous. Found: C, 75.54%; H, 7.75%; N, 8.85%; N-CH₃, 1.17%; OCH₃, 4.72%; act. H, 0.17%; microhydrogenation uptake H₂, 0.78 moles. Titration in methyl-cellosolve gave one step with a pK of 7.18. Calculated for C₄₀H₅₀O₃N₄: C, 75.67%; H, 7.94%; N, 8.82%; N-CH₃, 2.36%; OCH₃, 4.88%. The I.R. spectrum of geissospermine has bands at 3580 and 3410 cm⁻¹ belonging to OH or NH groups and in the carbonyl region a strong band at 1736 cm⁻¹. Otherwise the spectrum is too complex for assignments to be made at this stage. Cleavage of geissospermine with cold hydrochloric acid: Pure geissospermine (3.75 g) was ground with 10 ml of concentrated hydrochloric acid until no red color was produced with nitric acid as described by BERTHO³. The solution was poured on ice,

made alkaline, and extracted with chloroform. The product (3.17 g) was purified by chromatography on alumina. The bulk of the product was eluted with 0.5% methanol in chloroform. The chromatographed base (1.04 g) was then subjected to a 50 funnel countercurrent distribution between chloroform and phosphate buffer pH 6.6. Besides smaller amounts of impurities and about 200 mg in the first funnels about 660 mg formed a homogeneous peak between the funnels 35 and 46. These were converted into a picrolonate and recrystallized to a constant m.p. of 238–240°C. Found: C, 61.64%, 61.94%; H, 6.20%, 5.99%; N, 14.66%. Calculated for C₁₉H₂₆ON₂·C₁₀H₈O₅N₄: C, 61.91%; H, 6.09%; N, 14.94%. The free base was liberated from the picrolonate and sublimed in high vacuum at 140° for analysis. Found: C, 76.25%; H, 8.77%; N, 9.35%; N-CH₃, 2.84%; OCH₃, 0.0%; act. H, 0.67%. Calculated for C₁₉H₂₆ON: C, 76.47%; H, 8.78%; N, 9.39%; N-CH₃, 5.04%. It is, therefore, clear that we have in our hands the N-CH₃ carrying moiety of geissospermine but that it does not in its pure form agree with the compound described previously by BERTHO¹. The U.V. absorption of the compound is a typical dihydroindolic spectrum and it is of interest that the U.V. spectrum of geissospermine can be obtained by superimposing this spectrum on an indolic spectrum, for instance, that of cinchonamine. The I.R. spectrum of the C₁₉H₂₆ON base shows a weak band at 3319 cm⁻¹ and the carbonyl band at 1736 cm⁻¹ is not present. Reduction of geissospermine with LiAlH₄ gave surprisingly a beautifully crystalline compound, m.p. 178–180°C. which was recrystallized from ethyl acetate. Found: C, 75.31%; H, 8.40%; N, 8.90%; OCH₃, 3.38%; N-CH₃, 1.68%, pK (methyl cellosolve) 8.00. Calculated for C₄₀H₅₂N₄O₃: C, 75.44%; H, 8.23%; N, 8.79%; OCH₃, 4.87%; N-CH₃, 2.36%. The U.V. absorption of the compound is similar to that of geissospermine. It is remarkable that in the I.R. spectrum of this dihydrogeissospermine the strong band at 1736 cm⁻¹ remains unchanged. A strong band at 3150 cm⁻¹ is much more prominent than the bands in this region in geissospermine. Another property by which dihydrogeissospermine differs strongly from geissospermine is the resistance to even warm concentrated hydrochloric acid by which geissospermine is immediately cleaved.

K. WIESNER, W. RIDEOUT,
and J. A. MANSON

The Chemistry Laboratories, University of New Brunswick, Fredericton, New Brunswick, Canada, July 6, 1953.

Zusammenfassung

Die infraroten und ultravioletten Spektren und analytische Daten von Geissospermin wurden diskutiert. Die Spaltung von Geissospermin mit konzentrierter Salzsäure wurde wiederholt, und ein Spaltprodukt C₁₉H₂₆ON₂ wurde durch Gegenstromverteilung rein isoliert und durch ein kristallines Pikrolonat charakterisiert. Dieses Produkt besitzt ein Dihydroindolspektrum und trägt die N-methylgruppe des Geissospermins.

¹ A. BERTHO and H. F. SARX, Ann. Chem. 556, 22 (1944).

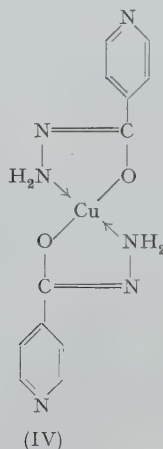
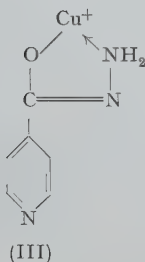
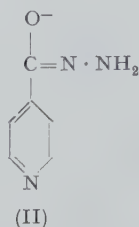
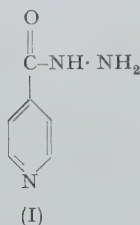
² A. BERTHO and F. MOOG, Ann. Chem. 509, 241 (1934).

³ A. BERTHO and G. VON SCHUCKMANN, Ber. dtsh. chem. Ges. 64, 2278 (1931).

⁴ A. BERTHO and H. F. SARX, Ann. Chem. 556, 22 (1944).

The Affinity of Isonicotinic Hydrazide for Metals

It has been shown that isonicotinic hydrazide (I) combines with cupric ions to give the 1:1-complex (III) and the 2:1-complex (IV)¹, and it has been claimed that the action of (I) against tuberculosis *in vitro* is increased when copper is supplied in excess of that normally present in the medium².



A good deal of work has been done in this Department on the determination of the stability-constants governing the equilibria between biologically active substances and their complexes with the ions of heavy metals³. Moreover, in collaboration with S. D. RUBBO and Mrs. GIBSON of the University of Melbourne, we have been able to show that 8-hydroxyquinoline (and related substances) are toxic to bacteria only when traces of iron or copper are present in the medium⁴. In this case, the 1:1-complex has been shown to be the true toxic agent⁵. Thus the likelihood exists that a 1:1 metallic complex of (I) is the true curative agent in tuberculosis.

Accordingly it was interesting to determine the stability constants K' governing the reaction (I) $\rightleftharpoons$ (III)

$$K' = \frac{[\text{complex (III)}]}{[\text{free metallic ions}][\text{free complex-forming species (I)}]}$$

¹ S. FALLAB and H. ERLNMEYER, *Exper.* **8**, 298 (1952). – E. SORKIN, W. ROTH, and H. ERLNMEYER, *Helv. chim. Acta* **35**, 1736, (1952).

² E. SORKIN, W. ROTH and H. ERLNMEYER, *Helv. chim. Acta*, **35**, 1736 (1952).

³ A. ALBERT, *Biochem. J.* **47**, 531 (1950); **50**, 690 (1952); **54**, 646 (1953).

⁴ S. D. RUBBO, Mrs. M. GIBSON, and A. ALBERT, *Brit. J. experim. Path.* **31**, 425 (1950).

⁵ A. ALBERT, Mrs. M. GIBSON, and S. D. RUBBO, *Brit. J. experim. Path.* **34**, 119 (1953).

This was done by potentiometric titration in 0.002 M-solution at 20°, by the method previously described¹. First of all, the ionization constants of (I)² were determined and the pK_a values were found to be 10.77 (± 0.05) for the acidic group, and 3.54 (± 0.04) and 1.85 (± 0.04) for the two basic groups. Thus, isonicotinic hydrazide is an acid of approximately the same strength as phenol, and "free complex forming species" in the equation refers to the anion (II). The two basic functions are very weak, and so close together that they had to be separated by the method of NOYES³. The higher value probably belongs to the ring-nitrogen (cf. 5.2 for pyridine⁴) and the lower one to the more remote of the hydrazine nitrogens (cf. 2.4 for glycine hydrazide⁵). Of these three constants for (I), only the stronger basic one has previously been determined⁶ and the result (3.52) is in excellent agreement.

The following values of $\log K'$ were obtained for the 1:1-complexes of type (III):

Cu^{++} (8.0); Ni^{++} (5.5); Zn^{++} (5.4); Co^{++} (4.8)

No values for Fe^{++} or Mn^{++} could be obtained because of the sparing solubility of the complexes. Fe^{+++} appeared to form no complex, in contrast to aureomycin and terramycin⁷ which combine more avidly with this cation than with the common bivalent ions which give values of $\log K'$ very similar to those obtained for (I).

Values of $\log K_s$ were sought for (I). This is the constant which governs the equilibrium between (I) and the 2:1-complexes of type (IV)⁸. Because of solubility difficulties, $\log K_s$ was obtainable only for Ni^{++} , where it was found to be 9.8.

All these values for the metal complexes of (I) are low when compared with the corresponding values for the complexes of the amino-acids. This suggests that these complexes would be most stable in those cells where the concentration of free amino-acids was low. It would be interesting to determine whether the toxic action of isonicotinic hydrazide on various strains of mycobacteria is in inverse proportion to their content of free amino-acids (or other intracellular metal-binding material). The abundance of such substances in the tissues of the host is commonly assumed and, if established, could explain the selectivity of (I).

Mr. E. P. SERJEANT is thanked for skilled technical assistance.

A. ALBERT

Department of Medical Chemistry, The Australian National University, London, N.W.1., June 17, 1953.

Zusammenfassung

Die Konstanten, welche das Gleichgewicht zwischen Isonikotinsäurehydrazid (I) und den mit Schwermetallen gebildeten Komplex (III) beherrschen, werden ermittelt. Die Bedeutung dieser Konstanten für die Chemotherapie der Tuberkulose werden diskutiert.

¹ A. ALBERT, *Biochem. J.* **47**, 531 (1950).

² Dried over P_2O_5 at 20°.

³ H. BRITTON, *Hydrogen Ions* (Chapman and Hall, London, 1942), p. 198.

⁴ A. ALBERT, R. GOLDACRE, and J. PHILLIPS, *J. Chem. Soc.* **1948**, 2240.

⁵ C. LINDGREN and C. NIEMANN, *J. Amer. chem. Soc.* **71**, 1504 (1949).

⁶ S. FALLAB, *Helv. chim. Acta* **36**, 3 (1953).

⁷ A. ALBERT, *Nature* **172**, 201 (1953).

⁸ S. FALLAB and H. ERLNMEYER, *Helv. chim. Acta* **36**, 6 (1953) have determined (spectrometrically) a value for $\frac{[\text{IV}]}{[\text{I}][\text{Cu}^{++}]}$. This value is not a constant but varies with the hydrogen ion concentration

Mikrobiologische Reaktionen¹

Seitenketten-Abbau und Dehydrierung bei Steroiden²

In neuerer Zeit hat die von PETERSON und Mitarbeitern³ eingeführte Methode zur mikrobiologischen Hydroxylierung von Steroiden, die insbesondere in 11 α - aber auch in 11 β -Stellung, ferner beispielsweise in 6-, 7-, 8-, 14- oder 16-Stellung erfolgt, praktische Bedeutung erlangt. Bei dieser Reaktion tritt gelegentlich auch Hydrierung von Doppelbindungen ein.

Die Untersuchung einer grösseren Anzahl von Schimmelpilzen ergab nun, dass gewisse Arten, speziell solche der Gattung *Fusarium*, wie *F. solani* oder *F. causicum*, erstaunlicherweise die Fähigkeit besitzen, Progesteron (I) unter aeroben Bedingungen in 1–2 Tagen mit sehr guter Ausbeute in Δ^{14} -Androstadien-3,17-dion (III) umzuwandeln. Diese bekannte Substanz wurde durch Mischschmelzpunkt, spezifische Drehung, Ultraviolett- und IR-Spektrum, durch Überführung in das Bis-2,4-dinitrophenylhydrazon und das Androstan-3,17-dion (Hydrierung mit Platinoxid in Eisessig und anschließende Oxydation mit Chromsäure) identifiziert. Bei dieser Reaktion wird also die Seitenkette zum Ringketon abgebaut und zugleich im Ring A durch Dehydrierung eine zweite konjugierte Doppelbindung eingeführt.

In weiteren Versuchen wurden eine Reihe anderer Steroide entsprechend behandelt (siehe Tabelle) und die Reaktionsprodukte teils in präparativem Maßstabe isoliert, teils papierchromatographisch nachgewiesen⁴. Dabei zeigte sich, dass 11-Desoxy-corticosteron (II) und Δ^4 -Androsten-3,17-dion (IV) ebenso rasch und gut in III umgewandelt werden wie I. Demgemäss ergaben auch Gemische von I und IV, wie sie durch Chromsäure-Oxydation von Cholesterylacetat-dibromid, anschlies-

sende Entbromung, Verseifung und Oppenauer-Oxydation erhalten werden, in guter Ausbeute III. Wurden hingegen Δ^5 -3 β -Oxyderivate, wie Pregnenolon (V) oder Dehydroisoandrosteron (VI), inkubiert, so waren die Ausbeuten an III geringer. Bei der Umwandlung von V liess sich zeigen, dass zuerst die Seitenkette zu VI abgebaut und letzteres dann zu III dehydriert wird. Offensichtlich verläuft also in diesen Fällen der Seitenkettenabbau und die dehydrierende Einführung der zweiten Doppelbindung sehr rasch, die Dehydrierung der Δ^5 -3 β -Oxy- zur Δ^4 -3-Keto-Gruppierung langsamer und schlechter.

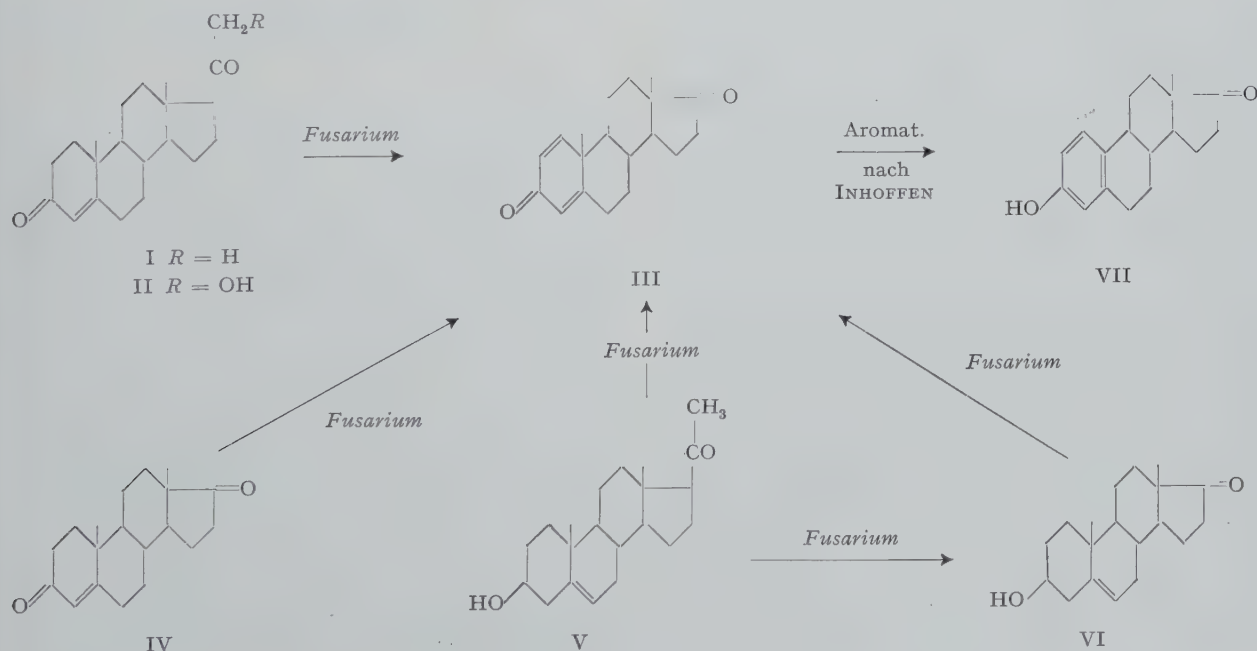
Wurde die Pilzkultur längere Zeit, nämlich etwa eine Woche, einwirken gelassen, so entstand aus allen genannten Ausgangsstoffen sowie aus III eine neue Substanz mit zusätzlicher Sauerstofffunktion («Oxydationsprodukt 2»).

Bei der Verwendung von Steroiden, die keine vom Kohlenstoffatom 5 ausgehende Doppelbindung aufweisen, wie Allopregnan-3,20-dion (VIII) und 3 β -Acetoxyallopregnan-20-on (IX), trat ebenfalls rascher Abbau der Seitenkette ein, wobei in den genannten Fällen das Androstan-3,20-dion (X) entstand. Letzteres liess sich aber nur langsam und mit mässiger Ausbeute zu III dehydrieren.

Nicht in der Seitenkette abgebaut wurden 17 α -Oxy-20-oxo-pregnene, wie REICHSTEIN's Substanz S und Cortison, sowie die untersuchten Verbindungen mit längerer Seitenkette (Δ^4 -3-Keto-bisnorcholensäure-methylester; Δ^4 -3-Keto- und Δ^5 -3 β -Oxy-norcholen-22-on; Δ^5 -3 β -Acetoxy-27-norcholesten-25-on).

Progesteron ist heute zweifelsohne das am leichtesten zugängliche Steroidhormon. Statt chemisch durch eine Vielzahl von Reaktionen kann es nun mikrobiologisch in nur *einer* Operation in der Seitenkette abgebaut und zugleich im Ring A dehydriert werden. Die Bedeutung des so entstehenden Androstadien-dions (III) liegt darin, dass es sich durch Aromatisierung nach INHOFFEN¹ wiederum in nur *einer* Reaktion zum Follikelhormon Oestron (VII) umwandeln lässt. Damit ist auch die

¹ H. H. INHOFFEN, *Ang. Chemie* 53, 471 (1940); 59, 207 (1947). – E. B. HERSBERG, M. RUBIN und E. SCHWENK, *J. Org. Chem.* 15, 292 (1950).



Einwirkung von *Fusarium solani* auf verschiedene Steroide

Eingesetzte Substanz (0,025% in Azeton oder Methanol zur Kultur gegeben)	Produkt nach Inkubation von Tagen		
	1	2	7
Progesteron (I)	III	III	«Oxyd. prod. 2»
11-Desoxy-corticosteron (II) . . .	III	III	«Oxyd. prod. 2»
Δ^4 -Androsten-3,17-dion (IV) . . .	III	III	«Oxyd. prod. 2»
$\Delta^{1,4}$ -Androstadien-3,17-dion (III).	III	III	«Oxyd. prod. 2»
Pregnenolon (V)	III + VI	III +	«Oxyd. prod. 2»
Dehydro-isoandrosteron (VI) . . .	III +	2 weitere Substanzen	+ 2 weitere Substanzen
Allopregnan-3,20-dion (VIII) . . .	1 weitere Substanz	III +	+ 2 weitere Substanzen
3 β -Azetox-allylopregnan-20-on	X	X	III
(IX)	X	X	III
Androstan-3,17-dion (X)	X	X	2 unbekannte Substanzen
REICHSTEIN's Substanz S	S +	S +	
Cortison (Compound E)	1 weitere Substanz	1 weitere Substanz	E +
	E +	E +	1 weitere Substanz
	1 weitere Substanz	1 weitere Substanz	

letztere, bisher noch verhältnismässig kostbare Substanz auf einem neuen, äusserst einfachen Wege gewonnen, der zweifelsohne technische Anwendung finden wird.

Im folgenden sei ein typischer Ansatz mit Progesteron beschrieben:

Die Nährlösung, enthaltend pro Liter Leitungswasser 15 g Pepton, 6 cm³ Maisquellwasser und 50 mg Rohglukose, wurde durch Zugabe von 2-n. Natronlauge auf pH 6,5 gebracht.

4 l dieser Nährlösung wurden gleichmässig in 13 Erlenmeyer-Kolben à 1 l verteilt, nach dem Sterilisieren mit *Fusarium solani* beimpft und bei 25° auf einer rotierenden Maschine geschüttelt (100 U./min). Nach 48 h gab man zu den gut entwickelten Kulturen unter sterilen Bedingungen in gleichen Anteilen eine Lösung von 1,0 g Progesteron in 45 cm³ Azeton zu, schüttelte noch weitere 48 h und filtrierte dann vom Myzel ab. Das Kulturfiltrat (pH 7,9) wurde erschöpfend mit frisch destilliertem Methylenchlorid ausgezogen, der Extrakt mit 0,1-n. Salzsäure, 1%ige Natriumhydrogenkarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der teilweise kristalline Rückstand (1,14 g) wurde an einer Säule von 30 g Aluminiumoxyd chromatographiert und letztere jeweils 3–4mal mit je 0,1 Liter Petroläther-Benzol-Gemisch (2:3), Benzol, Äther und Azeton eluiert.

Die papierchromatographische Untersuchung¹ der einzelnen Fraktionen zeigte, dass mit den beiden ersten Elutionsmitteln 84% des Gesamtgewichtes an reiner Substanz erhalten wurde, die sich als etwas weniger polar als Desoxy-corticosteron erwies und mit Phosphorsäure im UV.² eine ganz schwache, dunkelblaue Fluoreszenz zeigte. Aus wenig Azeton mit Petroläther umkristallisiert erhielt man rhombische Platten, die bei 145–146° schmolzen; Mischprobe mit $\Delta^{1,4}$ -Androstadien-3,17-dion ebenso. $[\alpha]_D^{25} = +110^\circ \pm 3^\circ$ (c = 1,060 in Chloroform). C₁₉H₂₄O₂ (284,38): Ber. C 80,24 H 8,51%; Gef. C 80,32 H 8,54%. UV.-Spektrum: $\lambda_{\max} = 243 m\mu$; log $\epsilon = 4,21$.

E. VISCHER und A. WETTSTEIN

Forschungslaboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel, Pharmazeutische Abteilung, den 10. September 1953.

¹ R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 35, 276 (1952). – System Propylenglykol-Toluol s. R. B. BURTON, A. ZAFFARONI und E. H. KEUTMANN, J. Biol. Chem. 188, 763 (1951); System A und B₃ s. J. E. BUSH, Biochem. J. 50, 370 (1952).

² R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 34, 2278 (1951).

Summary

Certain fungi, especially of the genus *Fusarium*, are capable of rapidly degrading the side chain of 20-ketopregnenes to the corresponding 17-ketones and, simultaneously, of dehydrogenating ring A. Thus $\Delta^{1,4}$ -3,17-diketo-androstadiene is formed almost quantitatively from Δ^4 -3,20-diketo-pregnenes and from Δ^4 -3,17-diketo-androstene, and in lower yields from the analogous Δ^5 -3 β -hydroxy compounds. The side chain of saturated 3-keto- or 3 β -hydroxy-allylopregnane-20-ones is also degraded quickly, but dehydrogenation in ring A proceeds more slowly. 17 α -hydroxy-groups prevent the degradation of the side chain.

By means of this microbiological process in combination with INHOFFEN's aromatisation reaction, progesterone can be transformed in only two steps into estrone.

Induction of Mutations in Bacteriophage T3 by Ultra-Violet Light

It has been shown that mutations¹ in a temperate bacteriophage λ can be induced by ultraviolet (UV) irradiation of the phage and of the bacteria in which they shall multiply. It seemed interesting to see if the same method applied to a typically virulent phage produced the same results. T3 was chosen because of its relatively high resistance² to UV irradiation, for fairly large doses are necessary to produce mutations. The mutations looked for were of the host range type³ (T3h). The phages were irradiated, in buffer, with a dose of UV leaving a surviving fraction of $9 \cdot 10^{-6}$. They were plated as a control, on a mixture of two strains of *Escherichia Coli*: B and B/3a (a very weak B/3) and on the same mixture of bacteria having received a dose of UV (in buffer) six times smaller than that given to phages.

As in the case of the temperate phage λ , a reactivation by UV'd bacteria of the UV inactivated phages took place: when the same number of UV'd T3 particles

¹ J. J. WEIGLE, Proc. Nat. Acad. Sci. 39, 628 (1953).

² R. DULBECCO, Radiations and Biologie, Oakridge (in press).

³ D. FRASER and R. DULBECCO, Cold Spring Harbor Symposium 1953.

were plated, for 100 plaques on non-irradiated bacteria, 600 plaques appeared on irradiated bacteria.

The control plaques showed that the stock of T3 used contained two h mutants among 12000 h^+ particles. These h mutants give, on mixed B + B/3a indicator, plaques that are clear right from the beginning of their growth. Among the phages reactivated by UV'd bacteria, there were 61 h mutants among 30000 h^+ particles, a proportion twelve times larger than that of the control.

The plaques of h mutants observed on irradiated bacteria were not sectored. Some of these plaques were picked, when very young, and analyzed. Each plaque was found to be pure within the accuracy of our analysis (1%) but different plaques were due to h mutants differing their plaque morphology.

In addition to these h mutations, others were observed showing diverse plaque morphologies, the increase over the control being again of the order of 10.

We conclude that mutations in virulent bacteriophage can be induced by ultraviolet irradiation of the phages and of the bacteria in which they shall multiply. Thus the production of mutations by ultraviolet irradiation is not restricted to temperate, inducible bacteriophage.

We wish to express our thanks to Miss L. HUBER for her assistance during these investigations.

J. J. WEIGLE and R. DULBECCO¹

Department of Biophysics, University of Geneva,
August 1, 1953.

Résumé

Il est possible d'induire des mutations chez le bactériophage virulent T3. Il faut pour cela irradier avec des rayons ultraviolets *et* les bactériophages *et* les bactéries dans lesquelles ils se multiplieront. Les mutations dont on a mesuré la fréquence concernaient le spectre d'action des phages (T3h), mais on en a observé d'autres agissant sur la morphologie des plaques.

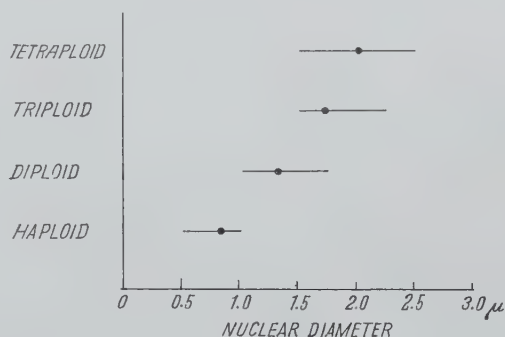
¹ Permanent address: California Institute of Technology, Pasadena (Calif.).

Interphase Nuclei and Cell Sizes in a Polyploid Series of *Saccharomyces*

Variations in cell dimensions and frequently in nuclear areas correlated with degrees of ploidy are well known cytological phenomena; they have been reported often in plants though their occurrence in higher animals is less common¹. Similar information concerning the fungal interphase nucleus is lacking, owing mainly to the recentness of intensive genetical interest in the fungi. Undoubted polyploid yeast stocks recovered through genetical procedures have been reported, however, by ROMAN *et al.*² and by LINDEGREN and LINDEGREN³. These stocks were not investigated cytologically. On the other hand, even cytological claims⁴ (unsupported by

any genetical analyses) of the existence of an extensive haploid to hexaploid series of yeast provide no information regarding size differences, if any, among the interphase nuclei of these cells. Indeed, had such measurements been made the true dimensions of the nuclei would not have been accurately assessable, since chemical fixatives, such as those hitherto used in yeast cytology, yield appreciably shrunken preparations.

The clones of a polyploid series (kindly supplied by Dr. C. C. LINDEGREN) we now consider, are of single cell origins. Their haploid, diploid, triploid, and tetraploid constitutions have been adequately established by the LINDEGRENS with the use of 6 to 11 genetical markers. The present report concerns cytological preparations of these clones obtained with the ALTMANN-GERSH¹ technique of freezing and drying, of which the superiority over conventional chemical fixatives is universally acknowledged. Advantages of the method consist principally in that shrinkage is absent or is negligible; diffusion currents within the cell are eliminated; and morphological and cytochemical preservation of the fixed cell approximates the living state as closely as is possible with known fixing agents.



Cells for freezing-drying were harvested from fermenting cultures as well as from vigorously aerated liquid medium and frozen in isopentane cooled to -155°C in liquid nitrogen. Dehydration in vacuum at -30°C was followed by immersion of the cells in chilled absolute alcohol. Celloidin sections of the fixed material were cut such that their thicknesses only slightly exceeded the longer dimensions of cells of each degree of ploidy, thus ensuring the inclusion of whole as well as sectioned cells. The conventional FEULGEN methods (HClO_4 or HCl hydrolysis) as well as the RAFALKO² modification were used with or without precipitation of the DNA as the lanthanum salt. Adequately differentiated hematoxylin-pyronin preparations were also obtained. These preparations are characterized by excellent uniformity of staining with the nucleus being very clearly differentiated from the cytoplasm.

The interphase nucleus is defined here as that single, spherical or near-spherical, extra-vacuolar area showing a positive FEULGEN reaction. I have been unable to corroborate LINDEGREN's "nuclear vacuole" view³, the polymorphic structures identified by him as chromosomes exhibiting, in my experience, neither a FEULGEN positive reaction nor increases in numbers consistent with ploidy, nor even an invariable presence in dividing cells stained with toluidine blue in fixed, or in fresh wet

¹ G. FANKHAUSER, Quart. Rev. Biol. 20, 20 (1945). – G. FANKHAUSER and R. R. HUMPHREY, Proc. Nat. Acad. Sci. 29, 344 (1943). – C. ARTOM, C. r. Acad. Lincei 32, 505 (1923); C. r. Soc. Biol. 99, 29 (1928). – F. SCHRADER, Chromosoma 3, 22 (1947). – C. BARIGOZZI, Proc. 7th Int. Cong. Genet., Suppl. (1941).

² H. ROMAN, D. C. HAWTHORNE, and H. C. DOUGLAS, Proc. Nat. Sci., Wash. 37, 79 (1951).

³ C. C. LINDEGREN and G. LINDEGREN, J. Gen. Microbiol. 5, 885 (1951).

⁴ B. RANGANATHAN and M. K. SUBRAMANIAM, J. Indian Inst. Sci. 34, 235 (1952).

¹ I. GERSH, Anat. Record 53, 309 (1932).

² J. S. RAFALKO, Stain Tech. 21, 91 (1946).

³ C. C. LINDEGREN, *The Yeast Cell. Its Genetics and Cytology*. (Educational Publishers, Inc., St. Louis, 1949).

	Haploid	Diploid	Triploid	Tetraploid
Nuclear diameter	0.84 μ	1.35 μ	1.73 μ	2.01 μ
Standard deviation	0.0195	0.0663	0.055	0.0833
Mean volume	0.31 c μ	1.288 c μ	2.711 c μ	4.252 c μ

preparations. Figure 1 shows graphically the increments in mean nuclear diameters (indicated by dots) and their ranges of variation in preparations of pure cultures representing each degree of ploidy. The interphase nucleus is seen as a homogeneously stained, vesicular body with no detectable chromatin threads. One hundred such nuclei of each degree in the series were measured in whole, randomly selected cells. Where a nucleus was so closely pressed onto the vacuole as to have a slight dent, its broadest diameter was estimated.

Increments in mean nuclear diameters and volumes are tabulated above.

Since about 22 to 28% of the nuclei in each class were slightly dented by the vacuole, the calculated mean volumes are only approximate. The increments in ranges of variation of diameter, probably associated with growth of the nucleus during interphase¹, will be noted.

These observations are in obvious refutation of LINDEGREN's identifying as the centrosome, a structure here shown to conform to the theoretically expected nuclear area—ploidy relationship. It should be stressed that RANGANATHAN and SUBRAMANIAM's² view that even single cell or single spore isolations cannot yield "pure" cultures owing to "somatic doubling" or irregular segregations of split chromosomes, finds no support in the present work. Such mechanisms, if prevalent, would be expected to yield genetical heterogeneity, involving the occurrence of variously sized nuclei, in a culture of initially single-haploid-cell derivation. Meticulous search in haploid preparations has failed, however, to reveal nuclei larger in diameter than haploid nuclei. Neither were cytological differences detected between preparations of aerobically grown and fermenting cultures of haploid origin, the nuclei in both cases falling within the range indicated in Figure 1. This is contrary to SUBRAMANIAM's thesis that fermenting cells differ cytologically from aerobically active cells and that endopoly-ploidy is a consequence of fermentative growth.

The size differences between the clones presently studied are as characteristic of the series as are the increases in total nuclear volumes; haploid cells are roundish and measure 2.81 μ in diameter while diploids measure $5.338 \times 2.658 \mu$, triploids $7.041 \times 3.591 \mu$, and tetraploids $7.964 \times 4.23 \mu$. These figures represent the mean of one hundred estimations for each class. Only single, non-budding cells were measured. These observations contrast markedly with those of DURAISWAMI and SUBRAMANIAM³ (whose "haploids", measuring $10.6 \times 7.2 \mu$, are actually larger than their "tetraploids" measuring $6.9 \times 6.6 \mu$) and indicate that their objection to using cell size as an aid to distinguishing genetical types is not universally valid. It is superfluous to add, in this con-

nection, that yeast geneticists have subordinated morphological criteria to the precise genetical diagnoses possible with biochemical markers but can invariably associate undoubted haploid segregants, in Mendelian as well as non-Mendelian (other than polyploid) asci, with small roundish cells. Matings between compatible segregants reinitiate ascus-size vegetative cells.

Part of this work was carried out at the University of Chicago. I am indebted to Prof. I. GERSH for facilities and advice. A discussion of the nuclear cytology of yeast will appear elsewhere.

This work was supported by grants from Southern Illinois University, U. S. Public Health Service, and Anheuser-Busch, Inc.

BALAJI D. MUNDKUR¹

Southern Illinois University, Carbondale, Ill., April 4, 1953.

Zusammenfassung

Durch Gefriertrocknung nach ALTMANN-GERSH wurden zytologische Präparate von einer genetisch geprüften polyploiden Serie von Hefe hergestellt. Die gemessenen Werte für Kern- und Zellgrößen stimmen in der theoretisch erwarteten Weise mit dem Grade der Polyploidie überein. Damit ist eine von höheren Organismen bekannte zytologische Erscheinung zum erstenmal für Mikroorganismen demonstriert.

Die Befunde stehen im Widerspruch zu LINDEGREN'S Annahme einer «Kernvakuole» und zu SUBRAMANIAM'S genetisch nicht fundierten Einwänden gegen die Brauchbarkeit von Einzelsporen-Kulturen, ebenso zur Ansicht des letztgenannten Autors, dass zytologische Unterschiede bestehen zwischen Zellen aus Gärungs- und solchen aus aeroben Kulturen.

¹ Present address: Indian Cancer Research Centre, Parel, Bombay 12, India.

Induction of Resistance to X-Ray Inactivation in *Saccharomyces* by Pre-Exposure to 2537 Å Ultraviolet Radiation¹

An exploratory study of the effects of combined ultraviolet and X-irradiation revealed a marked increase in the resistance to X-ray inactivation of a portion of the survivors of an ultraviolet irradiated population. In contrast, no change in sensitivity to ultraviolet radiation was observed in the survivors of an X-irradiated population.

A haploid stock, #13894, and a non-sporulating diploid stock, #11296 of *Saccharomyces cerevisiae* from the Carbondale pedigree were employed in this investigation. The ploidy for each stock has been established through genetical analyses and nucleic acid determination². 24 h old clones of each organism were maintained

¹ H. B. FELL and A. F. HUGHES, Quart. Rev. micr. Sci. 90, 355 (1949). – E. M. WERMEL and W. W. PORTUGALOW, Z. Zellforsch. 22, 185 (1935).

² B. RANGANATHAN and M. K. SUBRAMANIAM, J. Indian Inst. Sci. 34, 235 (1952).

³ S. DURAISWAMI and M. K. SUBRAMANIAM, La Cellule 53, 215 (1950).

¹ This work was supported by research grants from the U.S. Atomic Energy Commission, Contract AT(11-1)-176, and the Office of Naval Research, Department of the Navy, Contract (NR 164-140).

² M. OGUR, S. MINCKLER, G. LINDEGREN, and C. LINDEGREN, Arch. Biochem. Biophys. 40, 175 (1952).

at 4°C as stock inocula. Samples were prepared for irradiation by transferring a heavy loop of cells from a stock inoculum to a 250 ml flask containing 25 ml of clarified V-8 juice (pH 3.9), a commercial mixture of several vegetable juices. After 44 to 48 h growth on a rotary shaker at 30°C, the cells were harvested, washed twice with M/15 KH₂PO₄ and resuspended in M/15 KH₂PO₄ to a concentration of approximately 5×10⁶ cells per milliliter. 30 ml of the suspension was then transferred to a sterile PETRI dish to be irradiated. Cells prepared in this manner possess no buds, exhibit no cytologically detectable glycogen or volutin reserves and contain numerous prominent mitochondria.

irradiations the suspensions were continuously agitated by a magnetic stirrer. 1 ml samples were removed at intervals (Fig. 1 and 2) diluted in M/15 phosphate and plated in duplicate (controls in quadruplicate) in a medium containing: 2.0% dextrose, 0.2% BUDWEISER yeast extract, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 1.5% agar. Per cent survivals for given doses of radiation were determined from average macroscopic colony counts taken with the aid of a Quebec colony counter after three days incubation at 30°C.

Survival curves were plotted on semi-log paper with *S*, the fraction surviving, plotted along the axis of ordinates and the dose *D*, measured in ergs per square

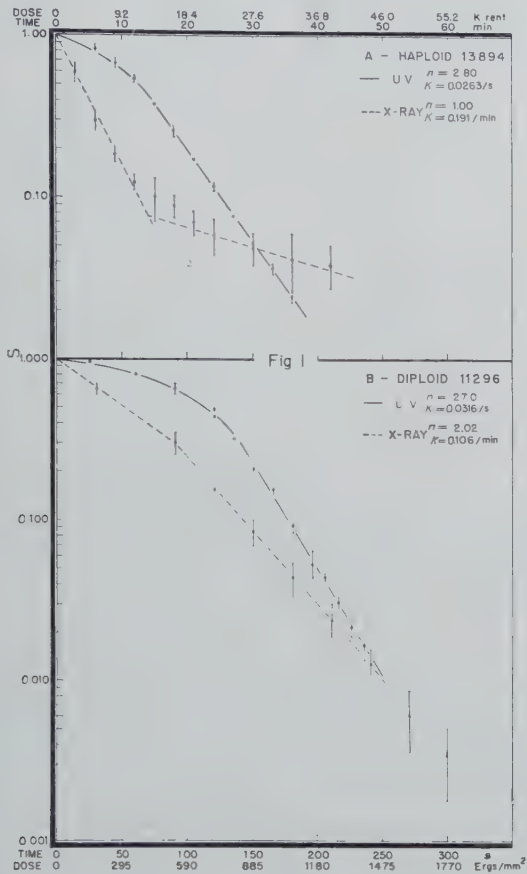


Fig. 1.—Standard survival curves for haploid and diploid yeasts were obtained by averaging the survival points for a number of independent determinations: 6 ultraviolet and 5 X-ray runs for the haploid, and 6 ultraviolet and 4 X-ray runs for the diploid. Standard deviations are shown for all points. The target value, *n*, and rate of logarithmic inactivation, *K*, for each curve is presented in the legend. The break in the haploid X-ray survival curve is similar to that reported by LATARJET and EPHRUSSI¹. All haploids from the Carbondale yeast breeding stocks, which have been subjected to X-ray analysis, yield survival curves that characteristically break between 5% and 10% survival.

The X-ray dosage was given at a rate of 920 R/min (measured by a 2500 r Victoreen dosimeter) from a tungsten target tube operated at 180 KVP with a total filtration of 2 mm of Al. The HVL was 0.22 mm Cu. The ultraviolet radiation was delivered at a rate of 5.900 ERGS/mm²/s (at the surface of the suspension) by a Hanovia quartz envelope lamp yielding 95% of its ultraviolet energy at the wave length 2537 Å. During

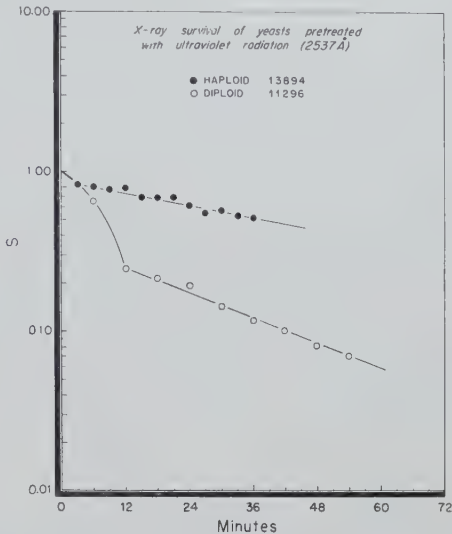


Fig. 2.—X-ray survival curves of the fraction of haploid and diploid yeast suspensions viable after pre-irradiation with ultraviolet to 5% survival. Breaks in diploid survival curves have not been observed previously.

millimeter per second for ultraviolet and kiloroentgens per minutes for X-rays on the axis of abscissae.

The straight line portions of the control curves were fitted by the method of least squares to the equation

$$\ln S = \ln n - KD$$

where *K* is the slope of the line, *D* is the dose and *n* its intercept on the axis of ordinates.

Two suspensions of the diploid 11296 were irradiated with X-rays to survivals of 10% and 2% respectively. Within 10 min of the completion of the X-ray exposure, ultraviolet survival curves were run on the surviving fractions. No change in the ultraviolet sensitivity was detected. Similar results were found with suspensions of the haploid 13894 pre-irradiated to 20% survival with X-rays.

When haploid or diploid yeast suspensions were irradiated to 5% survival with ultraviolet, the X-ray resistance of a portion of the surviving fractions was increased greatly (Fig. 2). This increase may be attributed either to some alteration in the cells brought about by the action of ultraviolet radiation, or to the presence in the original population of a fraction of cells resistant to both X-ray and ultraviolet irradiation. Under this latter hypothesis, pre-irradiation with ultraviolet selects for the resistant cells by destruction of sensitives. The "break" at 4% in the haploid X-ray control curve (Fig. 1), could be due to the presence of resistant cells to the number of 7%. The haploid ultraviolet survival

¹ R. LATARJET and B. EPHRUSSI, C. r. Acad. Sci. 229, 306 (1949).

curve, however, shows no break over the range investigated (100% to 2.5%). This must mean that the 7% of cells resistant to X-rays are normally sensitive to ultraviolet. Thus exposure of the haploid to a 5% survival dose of ultraviolet would kill 95% of the cells in both categories and subsequent exposure to X-irradiation would give a survival curve showing a break at 4% as before.

If the increase in resistance to X-irradiation of the ultraviolet survivors is due to the selection of a fraction resistant to both radiations, this fraction can be no greater than 2.5% of the original population. Therefore, under the assumption that the ultraviolet exposure which kills off 95% of the total population does not kill an appreciable number of the resistant cells, the percentage of resistant cells exposed to subsequent X-irradiation is 2.5/5% or 50%, and the break in the X-ray survival curve could not possibly occur at a higher value. Since the break obtained occurs at 90% survival, the hypothesis of a resistant fraction is not tenable for the haploid.

In the case of the diploid, the control X-ray survival curve was carried to 0.35% survival with no evidence of a break; therefore a resistant fraction could not represent more than 0.35% of a normal diploid population. Under the same assumptions as before, the break in the X-ray survival curve of cells surviving ultraviolet irradiation could not occur at a higher value than 0.35/5 or 7% survival. The observation of a break at 25% survival precludes the possibility that the X-ray resistant fraction was present prior to exposure to ultraviolet.

It is concluded that the increase in X-ray resistance must be due to an alteration in the cells brought about by ultraviolet radiation. This finding correlates with the observed suppression by ultraviolet radiation of X-ray induced chromosomal breakage in *Tradescantia*¹ and *Drosophila*² and suggest strongly that chromosomal aberrations are a highly significant aspect of cellular inactivation by X-rays.

A. SARACHEK and W. H. LUCKE

Biological Research Laboratory, Southern Illinois University, Carbondale, Ill., June 19, 1953.

Zusammenfassung

Ultraviolettbestrahlung von Hefekulturen bewirkt, dass nachher ein Teil der Zellen gegenüber der inaktivierenden Wirkung von Röntgenstrahlen vermehrte Resistenz besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass dies durch Zellveränderungen bedingt ist. Da bei *Tradescantia* und *Drosophila* ultraviolette Strahlen chromosomale Veränderungen unterdrücken, kann angenommen werden, dass bei der Hefe ein wesentlicher Teil der Zellinaktivierung infolge Röntgenbestrahlung auf chromosomalen Störungen beruht.

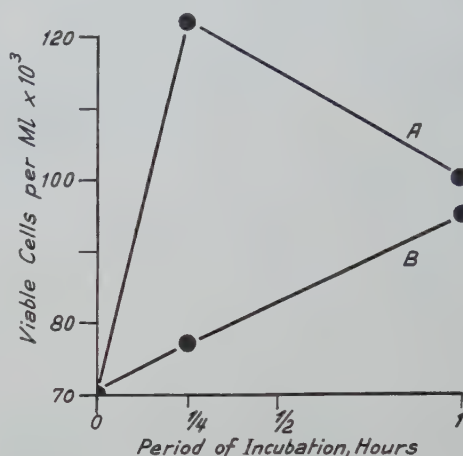
¹ C. P. SWANSON, *Genetics* 29, 61 (1944).

² B. P. KAUFMANN and A. HOLLAENDER, *Genetics* 31, 368 (1946).

Some Effects of Metabolic Inhibitors upon Survival of Ultra-Violet Irradiated *Escherichia coli*

We have recently had occasion to examine the effect of α -methyl glucoside upon the extent of survival of washed cells of the *histidineless* and *methionineless h-m-5b* strain of *Escherichia coli* following ultraviolet

irradiation. In early experiments (performed at room temperatures of 20–25°C) it was found that the presence of M/250 α -methyl glucoside during the irradiation of cells taken from stationary phase cultures usually resulted in a slightly greater degree of survival than for control suspensions. On the other hand, with cells harvested in the logarithmic phase of growth the glucoside appeared to enhance the lethal effect of the irradiation. It was, therefore, decided to attempt to elucidate further the mode of action of α -methyl glucoside in enhancing the survival of stationary phase cells.



An influence of postirradiation treatment with α -methyl glucoside upon the apparent degree of survival from ultraviolet irradiation.

A Control. B Treated with α -methyl glucoside

5 ml aliquots of washed cell suspension from stationary phase aerated cultures were irradiated at 4°C for 30 s. The suspensions were pooled and 4 ml portions diluted with 1 ml of (A) distilled water or (B) M/50 α -methyl glucoside. These suspensions were incubated at 37°C for varying periods of time, cooled to 4°C, washed and plated in synthetic medium containing glucose as carbon source.

Cultures were grown in a synthetic medium¹ supplemented with 50 μ g of *dl* methionine and 25 μ g of *l* histidine monohydrochloride per milliliter, with M/250 K gluconate (pH 7.2) as carbon source. The cultures were aerated by shaking on a mechanical agitator, and growth ceased from exhaustion of the supply of carbon source. Cells were plated in similar media containing 2% (w/v) of washed agar² and with appropriate carbon sources. Cells were irradiated by exposure of 5 ml aliquots of washed suspension (in distilled water) in rotating open PETRI dishes for 30 s at a distance of 13.5 cm from the centre of a Westinghouse "Sterilamp" low-pressure mercury vapour tube, stated to deliver 85% of its energy at a wavelength of 254 m μ . The cells were washed once with sterile distilled water prior to plating. All operations subsequent to the irradiation were performed under the light of amber lamps to prevent photoreactivation. Plates were counted after incubation at 37°C for 48 h and subsequently at daily intervals until the maximal number of colonies had appeared (3–5 days). The numbers recorded represent the mean value from two (or more) plates.

An attempt was made to determine whether the glucoside would affect the extent of survival when added to the cell suspension after completion of the irradiation. Unfortunately, however, the commencement of these

¹ A. W. RAVIN, *J. Gen. Microbiol.* 6, 211 (1952).

² F. J. RYAN, *Selected methods of Neurospora research*. Methods med. Res. 3, 51 (1950) (The Year Book Publishers Inc., Chicago.)

experiments coincided with the exceptionally hot summer of 1952 and no unequivocal result was obtained when all stages of the experiment were performed at room temperature (32–35°C). The addition of α -methyl glucoside after the irradiation resulted in up to a 100-fold greater degree of survival than in control suspensions. However, there was considerable death in both irradiated and unirradiated control suspensions due to heat inactivation (arising from the poor dissipation of heat generated during centrifugation).

The Effect of Postirradiation Treatment with Iodoacetate upon the Survival of Stationary Phase Cultures

Experiment No.	Unirradiated Control Viable Cells /ml·10 ⁷	Irradiated Control Viable Cells /ml·10 ⁸	Irradiated Cells Treated with M/5000 Iodoacetate Viable Cells /ml·10 ³
(1)	46	24	58
(2)	135	60	100
(3)	48	25	112
(4)	50	32	40
(5)	34	560	870

5 ml aliquots of washed cell suspension from stationary phase aerated cultures were irradiated at 31–34°C for 30 s. To 4 ml of irradiated suspension was added 1 ml of either water or M/1000 Na Iodoacetate (pH 7.2) and centrifugation commenced immediately in precooled centrifuge heads, the temperature of which rose to ca. 35°C after 15 min spinning. The cells were washed once and plated in synthetic medium with M/250 glucose as carbon source.

Experiments with cells irradiated at 4°C and subsequently incubated at 37°C prior to washing and plating did reveal an influence of post-irradiation treatment with α -methyl glucoside upon the observed degree of survival. The figure illustrates the results of one such experiment. Incubation at 37°C led to a transient recovery of some of the irradiated cells as measured by the ability to give rise to a visible colony (curve A), and this recovery process was inhibited by the glucoside (curve B). Some variation of results was obtained in different experiments. However, of nine experiments the transient recovery was observed in six, and for four of them the probability that the variations in apparent number of survivors could be attributed to sampling errors was found to be less than 0.001 by the chi-square test. Further, inhibition of the recovery was observed in all but one of these six experiments.

The demonstration of this effect of the glucoside did not, however, shed any light on the question of whether the extent of survival could be increased by post-irradiation treatment. α -methyl glucoside has been shown to be an inhibitor of the metabolism by *E. coli* and other microorganisms of a number of carbohydrates, and there is strong evidence suggesting that the inhibition of glucose metabolism is competitive in nature¹. It was, therefore, decided to examine the effect of post-irradiation treatment with other inhibitors of carbohydrate metabolism. Arsenate (competitive) gave similar results to those obtained with α -methyl glucoside. On the other hand, post-irradiation treatment with M/5000 iodoacetate for approximately 15 min (the time required for centrifugation of the suspension) consistently resulted in a higher degree of survival than for control suspensions (Table).

¹ S. D. WAINWRIGHT, *Biochim. Biophys. Acta* 11, 157 (1953). – F. H. JOHNSON and R. S. ANDERSON, *J. Cell. Comp. Phys.* 12, 273 (1938). – J. LEIBOWITZ and S. HESTRIN, *Biochem. J.* 36, 772 (1942).

Although the results presented here are preliminary in nature we believe them to be of importance in relation to hypotheses advanced to explain the action of ultraviolet light upon biological material. Our results do not warrant any detailed speculation, especially as the *h-m-5b* strain of *E. coli* is colicinogenic¹. However, as experiments now in progress with a strain of *Streptomyces*² indicate that postirradiation treatment with metabolic inhibitors can change the proportion of colonies exhibiting ultraviolet induced heritable variations of character either (i) without affecting the degree of survival or (ii) as some function of an effect upon the extent of survival, we believe that the results presented above can be most readily explained as the consequences of disturbances of the intracellular balance of metabolism.

Acknowledgment. It is a pleasure to record our indebtedness to Prof. F. J. RYAN for valuable criticism and encouragement. – This work was supported in part by an American Cancer Society grant recommended by the Committee on Growth of the National Research Council, and by a grant from the Division of Research Grants and Fellowships of the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service.

S. D. WAINWRIGHT³
and J. MULLANEY

Department of Zoology, Columbia University, New York 27, N. Y.; July 15, 1953.

Résumé

Le niveau apparent de survie des cellules d'*Escherichia coli* irradiées par rayonnement ultra-violet peut être modifié par «post irradiation» avec des inhibiteurs du métabolisme cellulaire.

¹ F. J. RYAN, personal communication.
² S. D. WAINWRIGHT and A. NEVILL, to be published.
³ Present address: Biology Division, Atomic Energy of Canada, Ltd., Chalk River, Ontario.

Incorporation *in vitro* de glycolle-I-¹⁴C dans les oocytes d'Astéries

On sait que de nombreuses recherches ont été effectuées, au moyen d'acides aminés marqués, dans le but de suivre la vitesse de synthèse ou de renouvellement des protéines; elles ont porté soit sur des homogénats d'organes (HULTIN¹) soit sur des embryons de Batraciens (BRACHET², FRIEDBERG et EAKIN³).

Il nous a semblé utile de suivre, par la méthode autoradiographique, le sort de l'acide aminé marqué au sein de cellules isolées en voie de croissance.

Nos observations ont porté sur des oocytes d'*Asterias rubens*, provenant de divers individus et se trouvant à des stades variables de la croissance.

Des lots d'une centaine d'oocytes, soigneusement lavés au préalable, ont été placés dans 5 cm³ d'eau de mer stérile, contenant 1 μ mole de glycolle, marqué sur le carbone du carboxyle.

Une première expérience, qui a porté sur des oocytes jeunes, avait pour but de vérifier si le glycolle pénètre effectivement dans la cellule. L'incubation, d'une durée de 5 h, a été suivie d'un lavage soigneux dans de l'eau de mer contenant du glycolle non marqué, puis, à deux reprises, dans de l'eau de mer stérile.

¹ T. HULTIN, *Exp. Cell. Res.* 1, 376 (1950).
² J. BRACHET (communication personnelle).
³ F. FRIEDBERG et R. M. EAKIN, *J. exp. Zool.* 110, 33 (1949).

Les oocytes ont été fixés pendant 1 h dans un mélange de 3 parties d'alcool à 94° pour 1 partie d'acide acétique. Après lavage à l'alcool, les cellules ont été dispersées en frottis sur des lames gélatinées.

Une mesure au compteur de GEIGER-MÜLLER a montré que ces manipulations réduisent d'un tiers la radioactivité globale.

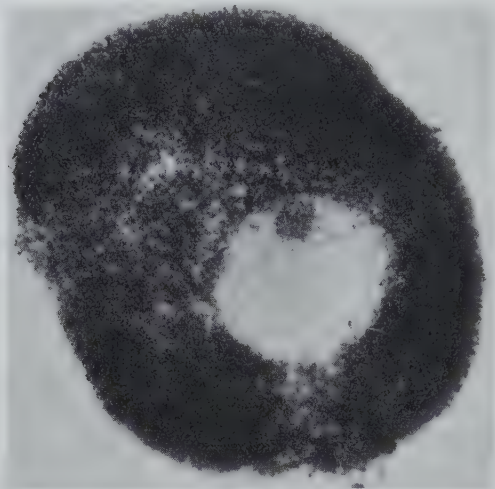


Fig. 1. Jeune oocyte ayant incorporé du glycocolle- $I-^{14}C$ coloré à la pyronine: on observe un noircissement du film au niveau des régions basophiles.

Les frottis ont été ensuite recouverts de «stripping film» Kodak d'une épaisseur de 4 μ suivant la méthode de PELC et HOWARD¹. L'autoradiographie a été développée après un mois d'exposition en chambre noire et la radioactivité a été appréciée en suivant l'intensité du noircissement.

La totalité du cytoplasme présente un noircissement d'aspect homogène; dans la vésicule germinative, il est limité au nucléole.

Si l'on colore les oocytes par la méthode d'UNNA après le développement, on note une coïncidence frappante entre l'intensité de la basophilie et celle de la radioactivité. Les nucléoles présentent le même phénomène lorsqu'on travaille sur des vésicules germinatives isolées au lieu d'oocytes entiers.

La Figure 1 illustre ces observations; il faut tenir compte, cependant, du fait que la coloration rouge due à la pyronine tend à exagérer le contraste entre le cytoplasme et la vésicule germinative.

Dans une deuxième série d'expériences, les autoradiographies ont été effectuées sur des coupes histologiques des oocytes; les conditions d'incubation étaient les mêmes que précédemment, sauf que deux lots différents ont été soumis à des traitements de 1 h et de 12 h respectivement. Les oocytes, inclus dans de l'agar, ont été coupés à 10 μ d'épaisseur et recouverts, cette fois, d'émulsion nucléaire (G_5 in gel form. ILFORD). Après 5 jours d'exposition en chambre noire, les autoradiographies ont été développées suivant la méthode que nous avons exposée antérieurement², puis lavées soigneusement et colorées par la méthode d'UNNA (Fig. 2).

Les traces d'électrons ont été dénombrées et rapportées à la surface de tissu responsable de l'émission

des particules ionisantes. Le tableau ci-dessous donne une idée de la concentration en glycocolle marqué dans les différentes régions de l'oocyte.

Tableau I

Durée d'incubation	Nombre de coupes observées	Nombre de trajectoires observées par mm ²		
		Cytoplasme	Vésicule germinat.	Nucléoles
1 h	225	120	100	6,300
12 h	150	318	256	6,000

Afin de distinguer la radioactivité due aux protéines de celle causée par les acides nucléiques (où le glycocolle peut s'incorporer en tant que précurseur des purines), une série de préparations ont été hydrolysées dans une solution d'HCl N à 60°, pendant 5 min, puis lavées à l'eau distillée et recouvertes d'émulsion photographique: on sait, en effet, qu'une telle hydrolyse élimine quantitativement l'acide ribonucléique (VENDRELY³). Les coupes colorées par la méthode d'UNNA, témoignent, après ce traitement, d'une disparition totale de la basophilie. Cette hydrolyse fait décroître de 75 % la radioactivité du cytoplasme, de 70 % celle du nucléole et de 35 % seulement, celle de la vésicule germinative. Il est vraisemblable, toutefois, que cette extraction enlève aussi une fraction minime des protéines.

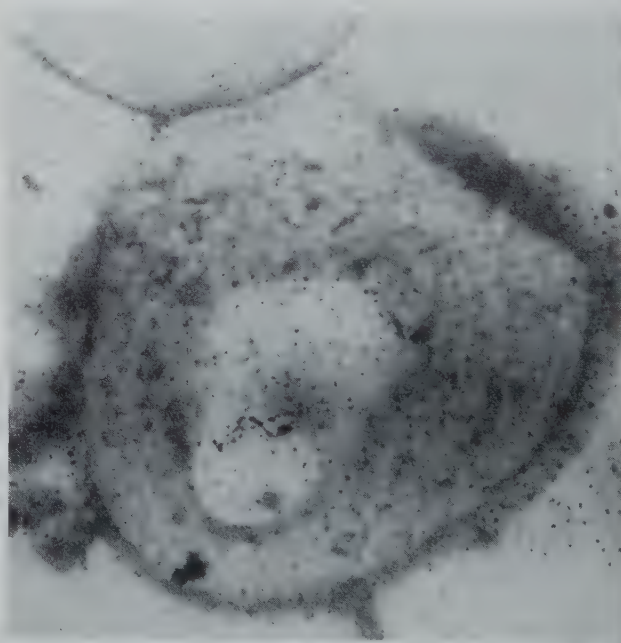


Fig. 2. Oocyte recouvert d'émulsion nucléaire montrant l'émission de deux électrons au niveau du nucléole.

En rapprochant ces données de celles de VINCENT³ et de BALTUS³, qui estiment à 5 % la teneur en A.R.N. du nucléole et à 10 % celle des granules cytoplasmiques, nous avons pu évaluer de façon approximative la radio-

¹ S. R. PELC et A. HOWARD, Brit. med. Bull. 8, 132 (1952).

² A. FICQ, F. GAVOSTO et M. ERRERA, Exp. Cell. Res. (sous presse).

³ R. VENDRELY et J. LIPARDY, C. r. Acad. Sci. 223, 342 (1946).

³ W. VINCENT, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 38, 139 (1952).

³ E. BALTUS (communication personnelle).

Tableau II

	Radioactivité due aux acides nucléiques				Radioactivité due aux protéines			
	1 h d'incubation	12 h d'incubation	% A.R.N.	Radioactivité spécifique relative	1 h d'incubation	12 h d'incubation	Extinction	Radioactivité spécifique relative
Cytoplasme . . .	90	236	10	90	30	79	0,530	57
Vésicule germinative . . .	35	90	—	—	65	166	0,410	159
Nucléole	4400	4200	5	8800	1900	1800	0,325	5850

activité spécifique relative de l'acide nucléique dans le nucléole et le cytoplasme.

D'autre part, des mesures microspectrophotométriques de la concentration en protéines des différentes régions de la cellule ont été effectuées suivant la méthode de MAZIA¹ sur des oocytes ayant séjourné pendant 1 h dans une solution de glycolle marqué. Les extinctions relatives indiquées au Tableau II nous ont permis de calculer la radioactivité spécifique due aux protéines.

Il semble donc que, pour des durées brèves d'incubation, l'incorporation du glycolle soit considérablement plus rapide dans le nucléole que dans le cytoplasme, tant au niveau des protéines que des acides nucléiques; ce phénomène s'atténue dans le cas des incubations prolongées, pour lesquelles un état de régime semble s'établir.

Il est intéressant de constater que la méthode autoradiographique, tout en permettant de localiser cette activité dans le nucléole, confirme les résultats obtenus par l'analyse chimique de noyaux entiers isolés à partir d'organes traités *in vivo* par le ³²P (JEENER et SZAFARZ², BARNUM et HUSEBY³, MARSHAK⁴).

(M^{me}) A. FICQ

Laboratoire de morphologie animale, Université de Bruxelles, le 15 mai 1953.

Summary

An autoradiographic method, based on the observation of individual particles, was used to determine the relative specific radioactivity of RNA and of the proteins in the different parts of the oocytes of *Asterias rubens*.

The nucleolus incorporates glycine in both fractions about 100 times more rapidly than the cytoplasm.

¹ D. MAZIA, P. BREWER et M. ALFERT, Biol. Bull. 104, 57 (1953).
² R. JEENER et D. SZAFARZ, Arch. Biochem. 26, 54 (1950).
³ C. P. BARNUM et R. A. HUSEBY, Feder. Proc. 8, 182 (1949).
⁴ A. MARSHAK et F. CALVET, J. cell. comp. Physiol. 32, 381 (1948); 34, 451 (1949).

Über die Ausscheidung und Speicherung von radioaktiv indizierten Xylanschweifelsäureestern

II. Dauer der Speicherung, Kumulierung, Vergleich mit Heparin

Wie aus der 1. Mitteilung¹ hervorgeht, lässt sich die Ausscheidung und Speicherung von blutgerinnungshemmenden Polysaccharidschwefelsäureestern durch Indizierung mit S³⁵ ermitteln. Die Versuche ergaben eine mit steigendem Polymerisationsgrad zunehmende Speicherung, insbesondere in Leber, Niere und Milz.

¹ E. HUSEMANN, E. G. HOFFMANN, R. LÖTTERLE und M. WIEDERSHEIM, Exper. 8, 153 (1952).

Nach eingehender Ausarbeitung der Methode¹ wurden weitere Versuche unternommen zur Klärung folgender für die therapeutische Anwendbarkeit der Substanzen wichtigen Fragen: Wie lange verweilt die gespeicherte Substanz im Organismus? Findet bei mehrfacher Injektion eine Kumulierung statt? Nimmt Heparin als körpereigene Substanz eine Sonderstellung ein, oder verhält es sich wie ein Xylanester gleichen Schwefelgehaltes?

Zur Untersuchung der beiden ersten Fragen verwendeten wir einen Xylanschweifelsäureester mit einem Z_η-Wert von 0,02 – das entspricht einem Polymerisationsgrad von 90² und 14,7% S (XSI).

Zur Bestimmung der Verweildauer der gespeicherten Substanz wurden 2 Kaninchen 100 mg/kg von XSI in physiologischer Kochsalzlösung intravenös injiziert und der Gehalt der Organe an Schwefelsäureester durch Messung der Aktivität nach 48 h bzw. 3 Wochen ermittelt.

Tabelle I

Verweildauer von Xylanschweifelsäureester XSI in den Organen

Organ	Spezifische Aktivität nach		Anteil der verabfolgten Aktivität in %	
	48 h	3 Wochen	48 h	3 Wochen
Leber. .	0,51	0,69	3,72	6,3
Niere. .	2,14	1,78	4,29	2,7
Milz. .	0,755	0,58	0,08	0,08

Man sieht aus der Tabelle, dass der Gehalt an Xylanester in drei Wochen in den meisten Organen nur unwesentlich absinkt, in der Leber sogar deutlich ansteigt. Gespeicherte Substanz wird also äusserst langsam wieder abgegeben.

Tabelle II

Vergleich der Gehalte von Xylanschweifelsäureester nach 1-, 5- und 14maliger Injektion von 100 mg/kg

Organ	Spezifische Aktivität Zahl der Injektionen			Anteil der verabfolgten Aktivität in % Zahl der Injektionen		
	1	5	14	1	5	14
Leber. . . .	0,51	4,95	6,51	3,72	8,44	3,51
Niere. . . .	2,14	8,14	11,68	4,29	2,48	1,27
Milz. . . .	0,78	5,64	20,6	0,08	0,09	0,12

¹ E. G. HOFFMANN, E. HUSEMANN, R. LÖTTERLE, M. WIEDERSHEIM und W. HERTLEIN, Makromolekulare Chemie (im Druck).
² Nach osmotischen Messungen von B. PFANNEMÜLLER liegt der K_m-Wert bei 3·10⁻⁴. Die bei der 1. Mitteilung mit 6,2 berechneten Polymerisationsgrade sind also entsprechend umzurechnen.

Zur Prüfung auf eine eventuelle Kumulierung injizieren wir einem Kaninchen 5 Tage lang jeweils 100 mg/kg, einem anderen 14 Tage lang die gleiche Dosis und arbeiteten die Organe 48 h nach der letzten Injektion auf. Die Tabelle II zeigt die Ergebnisse.

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten zeigt, dass der Gehalt an Xylanester bei mehrmaliger Injektion erheblich ansteigt. In der Leber erhöht er sich nach 5 Tagen auf das 10fache und nach 14 Tagen auf das 13fache des Wertes nach einmaliger Gabe. Die letzte Zahl deutet auf eine beginnende Sättigung. In der Milz ist der Anstieg noch erheblicher: nach 5 Tagen wird der 7fache und nach 14 Tagen der 25fache Wert erreicht. Diese Befunde über die Verweildauer der gespeicherten Substanz und die Kumulierung lassen eine wiederholte Anwendung derartiger Stoffe als bedenklich erscheinen.

Bei der Synthese blutgerinnungshemmender Schwefelsäureester dient stets das körpereigene Heparin als Vorbild. Wir indizierten daher diese Substanz¹ ebenfalls mit S³⁵ und untersuchten ihr Schicksal im Organismus auf die gleiche Art. Ausserdem stellten wir zum Vergleich einen Xylanester her, der in Schwefelgehalt und Viskositätszahl mit dem Heparin möglichst übereinstimmte. (Heparin: $Z\eta = 0,0057$, $S = 12,8\%$, XS II: $Z\eta = 0,0047$, $S = 12,2\%$).

Tabelle III

Vergleich der Aktivitäten der Organe nach 1- bzw. 5maliger Injektion von XS I, XS II und Heparin

Organ	Spezifische Aktivität					
	XS I		XS II		Heparin	
	1	5	1	5	1	5
Leber. . . .	0,51	4,95	0,11	0,34	0,093	0,27
Niere	2,14	8,15	0,33	2,0	0,78	3,4
Milz	0,78	5,6	0,35	1,3	0,56	1,2

Die Werte von XS II und Heparin liegen übereinstimmend niedriger als die von XS I. Wie ein Vergleich mit den Werten nach einmaliger Injektion zeigt, ist die Kumulierung wesentlich geringer als bei XS I.

Auch in der Verweildauer der gespeicherten Substanzen ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Aus der Tabelle IV sieht man, dass nach 3 Wochen die Aktivität in den Organen im Gegensatz zu XS I (vgl. Tab. I) erheblich abgenommen hat.

Tabelle IV

Verweildauer von XS II und Heparin in den Organen

Organ	XS II		Heparin	
	Spezifische Aktivität nach			
	48 h	3 Wochen	48 h	3 Wochen
Leber	0,107	0,068	0,093	0,052
Niere	0,33	0,185	0,78	0,33
Milz	0,35	0,20	0,065	0,062

Aus unseren bisherigen Ergebnissen folgern wir, dass der Schwefelgehalt entscheidend ist für die Dauer der Speicherung und die Kumulierung. Das körpereigene Heparin nimmt keine Sonderstellung ein, sondern ver-

hält sich innerhalb der Fehlergrenze ebenso wie ein Xylanester gleichen Schwefelgehaltes.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie der Dr.-Wander-GmbH., Bern und Säckingen, danken wir sehr herzlich für die Unterstützung der Arbeit.

E. HUSEMANN, B. PFANNEMÜLLER und W. HERTLEIN

Aus dem Staatlichen Forschungsinstitut für makromolekulare Chemie und dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br., den 28. März 1953.

Summary

The storage of anticoagulant Xylane sulfuric acid esters, as tested by the radioactivity of compounds containing S³⁵, is of an extremely long duration. After three weeks the quantity found in the liver is the same as that found after 48 h. Additional dosage results in further accumulation. Heparin is no exception since it behaves as Xylane sulfuric acid ester of the same viscosity and sulfur content.

La migration de l'hémoglobine additionnée au sérum humain lors de l'électrophorèse sur papier

Pour étudier l'influence de l'hémolyse sur l'électrophorogramme du sérum humain obtenu selon la technique de GRASSMANN et HANNIG¹, nous avons fait cheminer ensemble une solution à 4% d'hémoglobine humaine, non dénaturée, et un sérum humain de référence, choisi au hasard. L'appareil à électrophorèse était le Elphor H (tampon: véronal sodique/acétate/acide chlorhydrique, ph. 8,6, $\mu = 0,1$).

Pour l'hémoglobine pure nous avons toujours obtenu une seule tache (tache H) à mobilité de β -globuline (Fig. 1a). Ceci correspond aux observations de MOORE² qui utilise l'électrophorèse selon TISELIUS. Par contre, si après avoir appliqué 10 μ l d'une solution à 4% (0,4 mg) d'hémoglobine, nous ajoutions sur la même ligne 10 μ l du sérum humain choisi, nous observions après la migration et avant toute coloration, deux taches «hémoglobiques» nettement démarquées (taches h et H) (Fig. 1b). En réduisant à 1 μ l la quantité d'hémoglobine (0,04 mg), tout en maintenant le volume du sérum à 10 μ l, nous ne retrouvions que la tache h, à mobilité légèrement plus élevée que celle d'une β -globuline (Fig. 1c).

La coloration à l'amido schwarz 10B révéla que le sérum humain utilisé présentait une nette élévation des α_2 -globulines (1,0%). Dans une première série de contrôles, nous avons ajouté 0,4 mg d'hémoglobine à 10 μ l de sérums de diverses concentrations en α_2 -globuline. L'intensité de la tache h se révéla parallèle à la concentration en α_2 -globuline, la tache H restant d'intensité sensiblement constante. Dans une deuxième série, nous avons ajouté des quantités croissantes d'hémoglobine à 10 μ l d'un même sérum (α_2 -globuline: 1,7%). A partir de 0,24 mg d'hémoglobine, la tache h semble atteindre une intensité constante tandis que la tache H, nette à partir de ce volume, s'intensifie encore pour des quantités d'hémoglobine plus élevées.

¹ W. GRASSMANN et K. HANNIG, *Naturwissenschaften* 37, 496 (1950); Hoppe Seylers *Z. physiol. Chem.* 290 (1952). – W. GRASSMANN et L. HÜBNER, *Naturwissenschaften* 40, 272 (1953).

² H. MOORE, J. B. ROBERTS, M. COSTELLO et T. W. SCHONBERGEN, *J. Biol. Chem.* 180, 1147 (1949).

¹ Der Deutschen Hoffmann-La-Roche-AG. danken wir auch an dieser Stelle für die Überlassung von 2 g Heparin.

Tout se passe donc comme si, dans ces sérums, il y avait captation de l'hémoglobine par une α_2 -globuline qui se sature rapidement, après quoi l'hémoglobine migre librement et se place sur le front des β -globulines. Nous avons d'ailleurs pu montrer que cette captation de l'hémoglobine par une α_2 -globuline conduit à un complexe de mobilité intermédiaire entre celle d'une α_2 - et d'une β -globuline (Fig. 2). En effet, après l'addition d'hémoglobine, on trouve sur le phérogramme coloré à l'amido schwarz, une fraction apparemment nouvelle, entre les α_2 - et les β -globulines, et qui correspond à la tache *h* repérée au crayon. En même temps, l'emplacement des α_2 -globulines s'est vidé et il n'y reste qu'une fraction mineure qui ne semble pas avoir réagi. Ceci conduit au diagramme à trois sommets intriqués, que

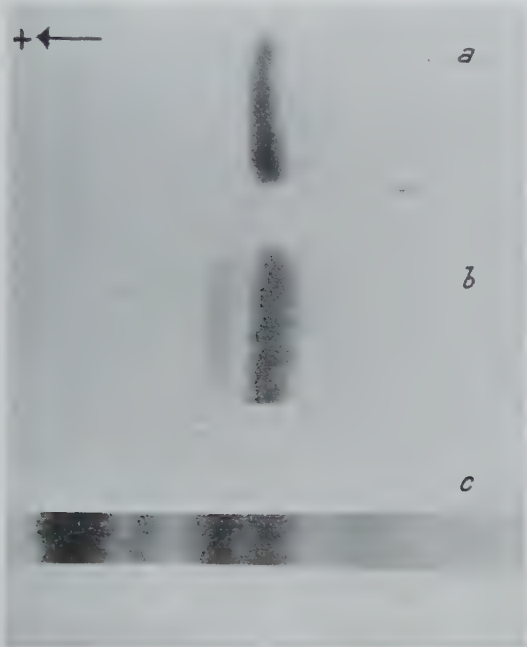


Fig. 1. *a* hémoglobine; *b* hémoglobine additionnée de 10 μ l de sérum; *c* hémoglobine additionnée de 1 μ l de sérum. La moitié supérieure du phérogramme est colorée à l'amido schwarz. Dans la moitié inférieure on perçoit la tache *h* très légèrement indiquée.

nous avons retrouvé sur des sérums légèrement hémolytiques.

La captation de l'hémoglobine par une α_2 -globuline rappelle le comportement de l'haptoglobine de JAYLE et POLONOVSKI¹. VAN ROYEN² a démontré d'autre part, que l'haptoglobine est congruente à une fraction importante et hautement variable des α_2 -globulines. Nous croyons donc pouvoir identifier la tache *h* au complexe haptoglobine/hémoglobine.

Cette observation nous semble d'un intérêt certain: toute trace d'hémolyse diminue apparemment la quantité des α_2 -globulines avant d'influencer l'estimation des β -globulines; cet effet sera d'autant plus net que l' α_2 -globuline sera en concentration supranormale. Ce phénomène fera donc écarter de l'analyse électrophorétique courante tous les sérums à trace d'hémolyse. Il pourrait, d'autre part, permettre un dosage de l'haptoglobine libre.

R. J. WIEME

Clinique médicale, Université de Gand, le 10 juin 1953.

¹ M. F. JAYLE et ABDELLATIF, Bull. Soc. Chim. Biol. 28, 80 (1946).
² A. H. H. VAN ROYEN dans L. W. JANSEN: *Electrophoretic studies on serum proteins* (1951), p. 94.

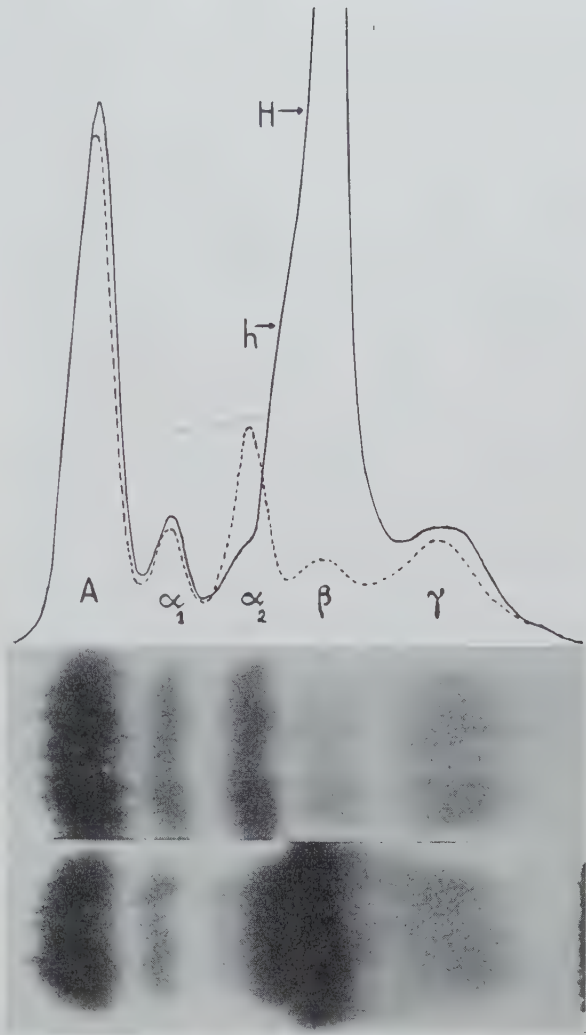


Fig. 2. Diagramme pointillé: sérum à élévation des α_2 -globulines; diagramme en ligne continue: même sérum après addition d'hémoglobine. – Pherogrammes: supérieur: même sérum; inférieur: même sérum additionné d'hémoglobine.

Summary

Using paper electrophoresis, the author found that when human hemoglobin is added to human sera, it is captured by a fraction of the α_2 -globulin, which results in a compound with an electrophoretic mobility between that of α_2 -globulin and β -globulin.

He identifies this fraction of the α_2 -globulin with the haptoglobin discovered by JAYLE. This phenomenon may influence the estimation of α_2 -globulin even in slightly hemolytic sera.

Catalase Inhibition: A Possible Mechanism for the Production of Heinz Bodies in Erythrocytes

It has long been recognized that inclusion bodies in mammalian red blood cells similar to those originally described by ROBERT HEINZ¹ can be produced *in vivo* and *in vitro* by many toxic substances. So diverse are

¹ R. HEINZ, Virch. Arch. path. Anat. 122, 112 (1890).

the compounds known to produce HEINZ bodies that no common factor is apparent among them, and WEBSTER¹ in a recent review was forced to conclude that "our knowledge of the relationship between chemical constitution and HEINZ body formation is quite fragmentary".

The appearance of HEINZ bodies in red cells is always associated with haemoglobin degradation, and it is widely accepted that the refractile inclusion bodies consist for the most part of products of haemoglobin breakdown. WARBURG *et al.*² and HORECKER³ showed that HEINZ bodies resemble denatured protein in structure and properties. Denaturation of the protein moiety of haemoglobin, then, would appear to be an early stage in HEINZ body formation. The precise fate of the haem prosthetic group is more problematical. ROSZA and SPICER⁴ have effectively separated the denatured globin from HEINZ bodies, which then contain only a small residue of protein, possibly as a contaminant. These extracted bodies are very opaque in electron micrographs, as are the HEINZ bodies developing *in situ* in the red cell⁵. The opacity has been attributed to the iron content of these bodies⁶. The haem group may thus also be degraded in HEINZ body formation, perhaps by opening of the ring at the α -methene linkage to give compounds of the type designated as choleglobin by LEMBERG⁷. A rather ill-defined group of green pigments can be obtained in haemoglobin degradation which appear to resemble one another spectroscopically, but not in other properties; for convenience they will be referred to by the general term "choleglobin". Intact haem, choleglobin and bile pigments can all be extracted from HEINZ bodies⁸.

There is also general agreement that HEINZ bodies contain lipid⁹. Numerous observers have remarked the fact that HEINZ bodies are formed at the periphery of the cell, and this has been confirmed by electron micrograph studies¹⁰. It has been proposed that the bodies are derived in part from the cell membrane¹¹, but BRAUNSTEINER *et al.*¹² have shown no connection between HEINZ bodies and the membrane and have proposed that the inclusions are derived from the erythrocyte stroma. In any case, the membrane is affected by the reactions as indicated by the markedly reduced osmotic fragility of red cells with HEINZ bodies¹³. Thus it would appear that

HEINZ body formation is associated with considerable alteration of the red cell components and that the breakdown of haemoglobin is only part of the process.

Some of the substances known to produce HEINZ bodies also lead to the formation of methaemoglobin, and many workers have accepted oxidation of haemoglobin as part of the sequence of events initiated by the toxic agent¹. However, inclusions of the same type occur in the cells of premature neonates in the absence of methaemoglobin formation³, and some compounds which form HEINZ bodies, such as methylene blue³ and Nile blue sulphate⁴, actually reduce methaemoglobin in the red cells. Thus methaemoglobin formation does not seem to be an essential stage in the process.

One common property of the toxic substances producing HEINZ bodies which has hitherto been overlooked is their direct or indirect inhibitory action on the enzyme catalase. Catalase is present in relatively large amounts in the red cell, where it is believed to catalyse the breakdown of hydrogen peroxide liberated by the dehydrogenation of substrates, notably hexose phosphate and lactate. We have supposed that in the absence of active catalase hydrogen peroxide might accumulate in the red cell in sufficient concentration to attack the haemoglobin and other cellular constituents. The work of LEMBERG and his associates⁵ has established that oxidative breakdown of haemoglobin to pigments of the choleglobin type can be accomplished easily by the action of hydrogen peroxide in the presence of a reducing agent, e.g. ascorbic acid. In intact red cells choleglobin is rapidly produced by the action of hydrogen peroxide generated by D-amino acid oxidase and methionine only when sodium azide is added; in the absence of this substance, a powerful catalase inhibitor, choleglobin is not formed⁶. Moreover, hydrogen peroxide oxidises haemoglobin in avian corpuscles, which have very little catalase, but not in mammalian red cells⁷.

Choleglobin formation has been observed by LEMBERG and LEGGE⁸ after injection of phenylhydrazine into rabbits. This agent, a potent producer of HEINZ bodies, greatly increased the amounts of choleglobin and biliverdin which could be isolated from the red cells. There is, in fact, a reasonably good correlation between the formation of green pigments of the choleglobin type and HEINZ bodies. Thus, KIESE and SEIPALT⁹ have demonstrated the presence of verdoglobins (probably choleglobin¹⁰) in dogs after the injection of hydroxylamine and aromatic amino and nitro compounds, all of which produce HEINZ bodies. Choleglobin formation together with HEINZ bodies were shown to occur after the administration of alloxan and ascorbic acid¹¹, and a similar association has been demonstrated by GAJDOS

¹ S. H. WEBSTER, *Blood* 4, 479 (1949).

² O. WARBURG, F. KUBOWITZ, and W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.* 242, 170 (1931).

³ B. L. HORECKER, *Publ., Health Rep.*, No. 285, 46 (1944).

⁴ G. ROSZA and S. S. SPICER, *Nature* 171, 84 (1953).

⁵ F. JUNG, *Naturwissenschaften* 30, 472 (1942). – H. BRAUNSTEINER, F. PAKESCH, and E. E. REIMER, *Wien. klin. Wschr.* 62, 244 (1950).

⁶ G. ROSZA and S. S. SPICER, *Nature* 171, 84 (1953). – W. HARTWICH, *Folia Haematol., Archiv* 13, 257 (1912).

⁷ R. LEMBERG and J. W. LEGGE, *Hematin Compounds and Bile Pigments* (Interscience, New York, 1949).

⁸ J. C. WHITE, J. V. DACIE, E. R. HOLLIDAY, G. R. BEAVEN, and E. A. JOHNSON, *Brit. Med. J.* 2, 357 (1951).

⁹ H. KUNKEL, *Folia Haematol. Archiv* 14, 430 (1912–13). – L. HESS and H. MÜLLER, *Wien. klin. Wschr.* 26, 1831 (1913). – M. GUTSTEIN and G. WALLBACH, *Virch. Arch. path. Anat.* 267, 144 (1928).

¹⁰ F. JUNG, *Naturwissenschaften* 30, 472 (1942).

¹¹ F. JUNG, *Naturwissenschaften* 30, 472 (1942). – J. C. WHITE, J. V. DACIE, E. R. HOLLIDAY, G. R. BEAVEN, and E. A. JOHNSON, *Brit. Med. J.* 2, 357 (1951). – M. KIESE and L. SEIPALT, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 200, 648 (1943). – F. JUNG, *Klin. Wschr.* 22, 42 (1943).

¹² H. BRAUNSTEINER, F. PAKESCH, and E. E. REIMER, *Wien. klin. Wschr.* 62, 244 (1950).

¹³ P. MORAWITZ and J. PRATT, *Münch. med. Wschr.* 55, 1817 (1908).

¹ S. H. WEBSTER, *Blood* 4, 479 (1949).

² H. WILLI and F. HARTMEIER, *Schweiz. med. Wschr.* 80, 1091 (1950).

³ S. S. SPICER and E. C. THOMPSON, *J. Indust. Hyg. Toxicol.* 31, 206 (1949).

⁴ M. GUTSTEIN and G. WALLBACH, *Virch. Arch. path. Anat.* 267, 144 (1928).

⁵ R. LEMBERG and J. W. LEGGE, *Hematin Compounds and Bile Pigments* (Interscience, New York, 1949).

⁶ E. C. FOULKES and R. LEMBERG, *Proc. Roy. Soc. [B]* 136, 435 (1949).

⁷ V. S. SHAPOT, *Biokhimiya* 3, 430 (1938). Quoted by⁵.

⁸ R. LEMBERG and J. W. LEGGE, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 18, 95 (1940).

⁹ M. KIESE and L. SEIPALT, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 200, 648 (1943).

¹⁰ R. LEMBERG and J. W. LEGGE, *Hematin Compounds and Bile Pigments* (Interscience, New York, 1949).

¹¹ D. MERLINI, *Folia Endocrinol.* 4, 1 (1951).

and TIPREZ¹ for a number of toxic agents. LEMBERG and LEGGE² have concluded that "the changes which are observed in erythrocytes after phenylhydrazine treatment are entirely consonant with choleglobin formation. The spectroscopic evidence, the isolation of free biliverdin, the appearance of denatured globin in the Heinz bodies and the presence of labile iron all represent aspects of a single process".

Perusal of a list of toxic substances producing HEINZ bodies³ reveals that many are known catalase inhibitors⁴, e.g. hydrazine, phenylhydrazine, acetylphenylhydrazine, hydroxylamine, potassium chlorate and potassium cyanide. Since most of these substances will combine with haem iron in general, they might act directly on haemoglobin or indirectly through catalase inhibition. Some of these substances, notably hydrazine, can produce choleglobin in solutions of haemoglobin¹, but it is difficult to fit all the known toxic substances into this pattern. We have therefore examined the possibility that agents producing HEINZ bodies act by inhibition of red cell catalase, and this communication embodies the results of our preliminary studies.

1. *Production of HEINZ bodies with sodium azide.*—To our knowledge, the production of HEINZ bodies by sodium azide, a potent catalase inhibitor, has not been previously examined. We have observed that human red blood cells incubated in 10^{-4} M solutions of sodium azide in isotonic glucose-citrate-saline contain a large number of HEINZ bodies after 6 h, as shown by supravital staining with 0.5% methyl violet.

The production of HEINZ bodies by sodium azide shows a marked temperature dependence. The optimal temperature is 37°C; at room temperature, few are formed, and at 1°C none at all. This confirms the results obtained by GAJDOS and TIPREZ¹ with other substances, and suggests that activation of one or more enzyme systems is involved.

2. *Production of HEINZ bodies with 2:4-dichlorophenol.* It has recently been reported that 2:4-dichlorophenol is a selective inhibitor of catalase⁵. This substance does not appear to combine with haem iron; there are no changes in the spectra of either catalase or haemoglobin in its presence, nor does it inhibit the activity of other iron-containing enzymes such as peroxidase. The inhibitory effect seems to be due to combination with the protein component of catalase. The compound gives 50% inhibition of purified catalase at a concentration of 2×10^{-6} M.

Incubation of human erythrocytes at 37°C for 6 h with solutions of 2:4-dichlorophenol in glucose-citrate-saline shows that large numbers of HEINZ bodies are produced in concentrations as low as 10^{-5} M; few of the red cells contain HEINZ bodies with concentrations of 2×10^{-6} M or less. There is the same temperature dependence as exhibited by azide.

The concentrations of 2:4-dichlorophenol that produce HEINZ bodies are similar to those known to inhibit catalase. As mentioned above, this substance does not combine with haem iron, and although the possibility does exist that it could combine with globin and degrade the haemoglobin by direct action, this seems unlikely.

These experiments suggest that catalase inhibition may be the first step in the reactions leading to the production of HEINZ bodies. This does not exclude

direct action of toxic substances on haemoglobin and it is probable that methaemoglobin is formed as an independent reaction with many of the compounds used. The hypothesis of catalase inhibition is supported by further evidence. Sulphapyridine has been shown by CLYMAN¹ to produce *in vivo* inhibition of catalase in the red cell and this drug is well known as a causative agent in the production of HEINZ bodies².

Interference with the action of catalase further provides a basis for explaining the production of HEINZ bodies by methylene blue³ and by Nile blue sulphate⁴. Dyes with a relatively high oxidation-reduction potential, notably methylene blue, accelerate the oxygen uptake of intact red cells⁵. Autoxidation of the dyes in this system leads to the production of hydrogen peroxide, which can combine with the haemoglobin and oxidise it. Such degradation of the haemoglobin would be prevented by active catalase, but excess hydrogen peroxide in this system inactivates the catalase irreversibly⁶. This type of inhibition by inactivation is typical of ascorbic acid⁶ and both choleglobin and HEINZ bodies can be produced in red cells by excess ascorbic acid⁷.

The view that catalase may function as a protective agent in the red cell is by no means new. BINGOLD⁸, in particular, attempted to prove that the function of catalase in the red cell is the protection of haemoglobin against destruction by hydrogen peroxide. However, his experiments were carried out with relatively enormous concentrations of hydrogen peroxide which bring about an unphysiological breakdown of haemoglobin to colourless products. The experiments cannot be accepted in support of his hypothesis, nor can his assumption that separation of catalase from haemoglobin in the kidney causes haemoglobin breakdown. Indeed, KEILIN and HARTREE⁹ have expressed doubts about the biological activity of catalase as a means of preventing accumulation of hydrogen peroxide in the cell; they suggest that it may have a peroxidative function in most cells. This view is not shared by LEMBERG and LEGGE¹⁰, and the results of our investigations support the earlier belief that, in the erythrocyte at least, catalase functions as a protective agent for the whole cell against the products of respiration. Substances inhibiting catalase and thereby leading to an accumulation of hydrogen peroxide would produce degradation of haemoglobin and also other cell components, in particular the lipoids and proteins of the membrane and the stroma. Further experiments are being carried out to investigate the relation of breakdown of these components to the formation of HEINZ bodies.

S. BRENNER¹¹ and A. C. ALLISON¹²

Physical Chemistry Laboratory, Oxford and Clinical Pathology Laboratory, The Radcliffe Infirmary, Oxford July 24, 1953.

¹ M. CLYMAN, *Ann. Int. Med.* **14**, 406 (1940).

² S. MOESCHLIN, *Schweiz. med. Wschr.* **21**, 786 (1940).

³ S. S. SPICER and E. C. J. THOMPSON, *J. Indust. Hyg. Toxicol.* **31**, 206 (1949).

⁴ M. GUTSTEIN and G. WALLBACH, *Virch. Arch. path. Anat.* **267**, 144 (1928).

⁵ G. A. HARROP and E. S. G. BARRON, *J. Exp. Med.* **28**, 207 (1928).

⁶ R. LEMBERG and J. W. LEGGE, *Biochem. J.* **37**, 117 (1943).

⁷ E. C. FOULKES and R. LEMBERG, *Proc. Roy. Soc. [B]* **136**, 435 (1949). — A. GAJDOS and G. TIPREZ, *Sang.* **18**, 35 (1947).

⁸ K. BINGOLD, *Klin. Wschr.* **14**, 1287 (1938).

⁹ D. KEILIN and E. F. HARTREE, *Biochem. J.* **39**, 289 (1945).

¹⁰ R. LEMBERG and J. W. LEGGE, *Hematin Compounds and Bile Pigments* (Interscience, New York, 1949).

¹¹ Overseas Science Research Scholar of the Royal Commission for the Exhibition of 1851.

¹² Staines Medical Research Fellow of Exeter College, in receipt of a grant from the Medical Research Council.

¹ A. GAJDOS and G. TIPREZ, *Sang.* **18**, 35 (1947).

² R. LEMBERG and J. W. LEGGE, *loc. cit.*

³ S. H. WEBSTER, *Blood* **4**, 479 (1949). — A. GAJDOS and G. TIPREZ, *Sang.* **18**, 35 (1947).

⁴ H. BLASCHKO, *Biochem. J.* **29**, 2303 (1935).

⁵ P. L. GOLDAKRE and A. W. GALSTON, *Arch. Biochem. Biophys.* **43**, 169 (1953).

Zusammenfassung

Experimentell wird gezeigt, dass Heinzsche Körper durch niedrigere Konzentrationen von Natriumazid und 2:4-dichlorphenol gebildet werden. Diese Substanzen hemmen Katalase stark, und es wird angenommen, dass die Katalasehemmung die erste Stufe beim Abbau von Hämoglobin und anderer Zellbestandteile ist. Dies führt zur Bildung von Heinzschen Körpern.

Über einen muskelaktiven Wirkstoff aus der Adrenalinreihe (Adrenochrom)¹

Die Isolierung des ausserordentlich flüchtigen und im Gewebe – vor allem im quergestreiften Muskel – verbreiteten Wirkstoffes Adrenochrom (GREEN und RICHTER²) und die Darstellung eines stabilen Präparates Monosemikarbazonderivat des Adrenochroms (BRACONIER, LE BIHAN und BEAUDET³), nämlich das Adrenoxyl⁴, hat neuerdings unser Interesse erweckt und neue Gesichtspunkte für das Studium des Muskelstoffwechsels eröffnet.

Bekanntlich wird Adrenochrom aus dem Adrenalin über das entsprechende Chinon aufgebaut (Formel).

Das Adrenochrom ist als ein Oxydationsprodukt des Adrenalins und wirkt als hochaktiver Wasserstoffüberträger für bestimmte Oxydoreduktionsprozesse. Dies geht auch aus dem hohen Redoxpotential des Adrenalinchinons hervor, nämlich $E' + 380$. Es spielt also eine wesentliche Rolle bei katalytisch-fermentativen Prozessen im Organismus des Säugetieres.

Eine Analyse der biologischen Wirkung des Adrenochroms war erst mit Hilfe des stabileren Adrenoxyls, das im Körper zu Adrenochrom abgebaut und schliesslich durch die Nieren zum Teil als Indol (6%) ausgeschieden wird (FISCHER und LECOMTE⁵), möglich.

Diese Studien zeigten einige für die Physiologie des Muskelstoffwechsels sehr interessante Ergebnisse.

Methodik

1. Die indirekte Reizung des freipräparierten Musculus gastrocnemius führt beim Kaninchen (unter Urethannarkose) nach Adrenoxyl-Vorbehandlung - intraarterielle Injektion von $1 \times 50 \gamma$ Adrenoxyl/2 kg - zu einer deutlichen und signifikanten Kontraktionsverstärkung. Diese tritt schon nach 5 min ein und erreicht nach 15 min eine hohe, nach 40 min die höchste Wirkung. Nach etwa 60 min fällt die Kurve wieder langsam, nach einem Tetanusreiz sehr steil ab.

¹ Herrn Professor Dr. HANS VON EULER, Stockholm, zum 80. Geburtstag.

² D. E. GREEN und D. RICHTER, Biochem. J. 31, 596 (1937).

³ F. BRACONIER, H. LE BIHAN et C. BEAUDET, Arch. internat. Pharm. Ther. 69, 181 (1943).

⁴ Für die freundliche Überlassung der Versuchsmengen des Präparates Adrenoxyl sei den Herstellern, Labaz AG. (Basel, Brüssel, den Haag, Paris), bestens gedankt.

⁵ P. FISCHER und J. LECOMTE, J. Rev. Med. Liège 6, [9], 224 (1951).

2. Einen analogen Effekt erzielt man bei Ratten (in Narkose). Nach intravenöser Injektion einer Adrenoxyl-lösung (1 mg/Tier), führt die indirekte Reizung des Musculus gastrocnemius zu einer rasch ansteigenden, langanhaltenden (über 60 min) Kontraktionsverstärkung, die wir graphisch (in Kurve Nr. 1b) festhielten.

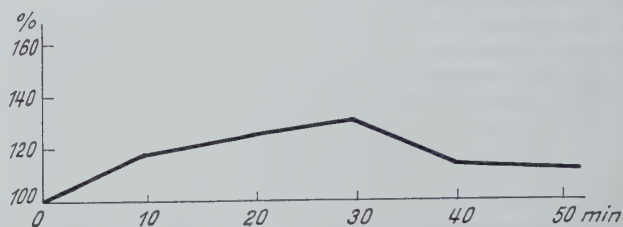


Abb. 1a. Mittelwertskurve (mittleres Summenpolygon) des Verhaltens vom Musculus gastrocnemius (Ratten) nach indirekter Reizung, je 3 Reize nach 2 min ohne Adrenoxylvorbehandlung.

3. Beim Menschen liess sich ein «muskeldynamischer Effekt» des Adrenochroms nach Verabreichung des Derivats Adrenoxyl ebenfalls feststellen. Die Wirkung trat schon am 3., deutlicher jedoch am 6. Tag nach täglicher Injektion von 0,5 mg Adrenoxyl (1 Ampulle) intramuskulär oder 3×1 bis 4×2 Adrenoxyltabletten zu 2,5 mg täglich ein. Beim Menschen lässt sich die Wirkung nicht am einzelnen Muskel, sondern nur in der Gesamtheit und bestenfalls an einem Muskelbündel studieren. Die Prüfung fand am 3. und am 6. Tag nach Adrenoxylverabreichung durch Messung und Registrierung der Arbeitsleistung des rechten oder linken Mittelfingers am Ergograph nach Mosso statt. Durch Fixierung des Unterarmes am Prüfungstisch wird nur eine Beugung-Hebung des gestreckten Mittelfingers ermöglicht. An seinem Endglied wird ein 2-kg-Gewicht mit einer Lederschlinge befestigt. Dieses Gewicht soll durch Beugung des Mittelfingers in der Zeiteinheit (je Sekunde) maximal gehoben werden. Die Hubhöhe sowie Hubzahl können durch Zeiger auf die rotierende Trommel übertragen und so registriert werden bis zur völligen Ermüdung des betreffenden Muskelbündels (Musculus flexor und extensor digiti III). STANGL¹; STANGL, JOCHUM, KWERCH²; STANGL³.

Zu analogen Ergebnissen kam GOFFART⁴, der die muskelaktive Wirkung des Adrenochroms in Form seines Monosemikarbazonderivates (Adrenoxyl) am Rattenzwerchfell nachwies, und CONTAMIN und PARROT⁵ am isolierten Froschmuskel. Sie berichten nicht nur über die deutliche Kontraktionsverstärkung des arbeitenden Muskels, sondern letztere wollen auch eine Sympathikus-erregung entsprechend der unter dem Namen Orbelli-Phänomen bekannten klassischen Adrenalinwirkung festgestellt haben.

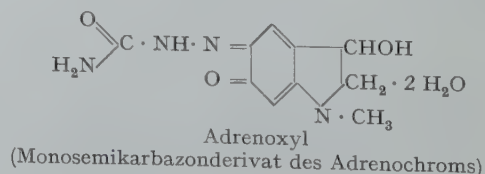
¹ E. STANGL, Praxis (Schweiz) 35, 713 (1951).

² E. STANGL, H. JOCHUM und H. KWERCH, Praxis (Schweiz) 3, 46 (1952).

³ E. STANGL, Ther. Umsch. 4/5, 64 (1953).

⁴ M. GOFFART, Soc. Belge Biol. 1020 (séance 30. avril 1949).

⁵ F. CONTAMIN und J. L. PARROT, C. r. Soc. Biol., 28. Mai 1949.



Im Gegensatz hierzu zeigt Adrenochrom bzw. dessen Derivat *Adrenoxyl* keine adrenalin- oder arterenolähnliche Wirkung. Die Applikation des *Adrenoxyls* führt weder zu Blutdruckerhöhung noch zu sekundärer Gefässerweiterung (TZANCK und SOULIER¹).

4. Bei der Katze (in Chloralnarkose) führt die intravenöse Injektion von 50 γ *Adrenoxyl* zu keinem Blutdruckanstieg, analog wie nach Kochsalzinjektion und im Gegensatz zu Adrenalin (30 γ i.v.).

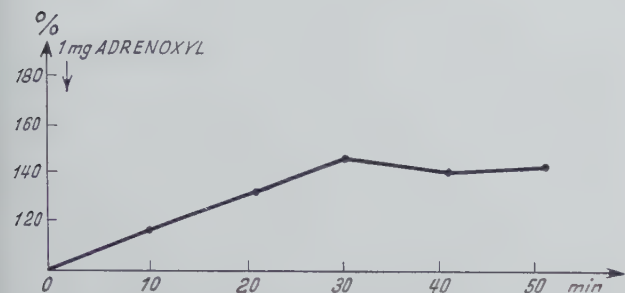


Abb. 1b. Kontraktionsverstärkung des Musculus gastrocnemius der Ratte (in Narkose) bei indirekter Reizung mit Induktoren. Je 2 min 3 Reize nach Injektion von 1 mg *Adrenoxyl* i.v.

5. Die Wirkung des *Adrenoxyls* auf den isolierten Darm (also glatte Muskulatur) ist nicht einheitlich und teilweise umstritten (JOCHUM und STANGL²; (KUSCHINSKY *et al.*³).

Diskussion

Wie schon LEHNARTZ seinerzeit die Ansicht äusserte, dass an den chemischen Vorgängen der Muskelkontraktion das Adrenalin, und zwar in Form des Oxydationsproduktes Adrenochrom bei den verschiedenen Oxydoreduktionsprozessen als Wasserstoffüberträger mitbeteiligt ist, haben in der Folgezeit eine Reihe von Forschern dies bestätigen und beweisen können (GREEN und RICHTER⁴; DESFONTAINES⁵). Vor allem hat WAJZER⁶ die Funktion und den Mechanismus der biochemischen Vorgänge im Muskelstoffwechsel eingehend studiert und die bei diesen komplizierten Vorgängen spielende Rolle des Adrenochroms in folgender Form zusammengefasst:

1. Adrenochrom hemmt die Glykolyse im Muskel in der Verdünnung 1:1 Million.

2. Dieselbe Konzentration verhindert die Bildung von Hexosediphosphat und ermöglicht die Glykogensynthese.

3. Diese vom Coriester ausgehende Glykogensynthese wird durch Adrenochrom deutlich beschleunigt, im Gegensatz zu Adrenalin.

4. Die Bildung des Phosphokreatins unter Adrenochromwirkung.

Das Vorkommen dieses Adrenalinoxidationsproduktes im quergestreiften Muskel (BACQ⁷, CALDEYRO-

BARCIA¹, ROSKAM und DEROUAUX²) und im Herzmuskel (OUTEVSKY³) spricht für gewisse Aufgaben des Adrenochroms im Muskelstoffwechsel. Diese näher zu erfassen war das Ziel meiner Studien.

E. STANGL⁴

Medizinische Universitätsklinik Innsbruck, den 8. März 1953.

Summary

The application of monosemicarbazone derivative of Adrenochrom (*Adrenoxyl*) indicates a muscle-active effect (decrease of contraction and retardation of muscle tiredness) in rats, in rabbits and in man.

¹ R. CALDEYRO-BARCIA, Arch. Soc. Biol. Montevideo 13, 186 (1946).

² J. ROSKAM und G. DEROUAUX, Arch. internat. Pharm. Ther. 69, 2 (1943); 69, 348 (1944).

³ A. M. OUTEVSKY, Ousp. Sovr. Biol. Nr. 2, 145.

⁴ Jetzige Adresse: Falun, Schweden.

Zur tierexperimentellen Prüfung eines neuen Lebertotalextraktes¹

Klinische Untersuchungen ergaben gute therapeutische Resultate mit einem Lebertotalextrakt bei chronischen Lebererkrankungen (JASINSKI², KALK und WILDHIRT³). Die Leberfunktionsprüfungen normalisieren sich weitgehend.

Es lag uns daran, die Wirkung des Extraktes am lebergeschädigten Tier zu prüfen. Als leberschädigendes Agens wählten wir Tetrachlorkohlenstoff im akuten und im chronischen Versuch an, sowie die partielle Hepatektomie. Die Versuche wurden an Ratten durchgeführt. Kriterien der Wirksamkeit waren:

1. Die Leberfunktionsprüfung mit Bromsulphalein (Ausscheidungsprobe),
2. der Fetttransport (lipotrope Wirkung),
3. das quantitative Verhalten der Serumproteine, insbesondere der Albumine im elektrophoretischen Bild.

I. Bromsulphaleintest⁴ an CCl₄-vergifteten Ratten. Es handelt sich in diesem Versuch um Tiere mit einer akuten CCl₄-Intoxikation. 150–180 g schwere Ratten erhielten nach 12stündigem Fasten eine intraperitoneale Injektion von 0,3 cm³ einer 10%igen CCl₄-Lösung in Arachisöl. Nach weiteren 14 h Fasten wurde die Bromsulphalein-Leberfunktionsprobe ausgeführt. Die behandelten Tiere hatten kurz vor der CCl₄- und kurz vor der BS.-Injektion 0,2 cm³ Leberextrakt s.c. erhalten (siehe Tabelle I A).

Die behandelten Tiere zeigen eine viel geringere Retention als die nur CCl₄-geschädigten: Durchschnittswert 6,15 (Streuungsbreite 2,55–10,6), gegenüber 15,28 (11,4–18,7). Eine Retention unter 2 mg% ist normal, was schon durch frühere Versuche gefunden wurde.

II. Bromsulphaleintest an Ratten mit partieller Hepatektomie. Ratten von 180 bis 200 g wurden in Äthernarkose partiell hepatektomiert⁵, wobei etwa 50–70%

¹ A. TZANCK und M. SOULIER, P. M. 3, 21 (1948).

² H. JOCHUM und E. STANGL, nicht publiziert.

³ H. KUSCHINSKY *et al.* (im Druck).

⁴ D. E. GREEN und D. RICHTER, Biochem. J. 31, 596 (1937).

⁵ G. DESFONTAINES, Ann. Biol. Clin. März/April 1948.

⁶ J. WAJZER, Bull. Soc. Chim. Biol. 29, 237, 341, 347 (1947).

⁷ Z. M. BACQ, Bull. Acad. suisse Sci. med. 4, 2, 127 (1948); J. Pharm. exp. Ther. Part. II 95, 1 (1949). – Z. M. BACQ, R. CHARLIER, E. PHILIPPOT et G. DUNON, Arch. internat. Physiol. 57, 62 (1949). – Z. M. BACQ und G. DEROUAUX, Sem. Hôp. Paris 26, Nr. 65 (2. Sept. 1950). – Z. M. BACQ, J. LECOMTE und P. FISCHER, Bull. Soc. Chim. Biol. 31, 395 (1949).

¹ «Ripason» der Robapharm Laboratoriums-AG., Basel.

² B. JASINSKI, Schweiz. Med. Wschr. 83, 5, 112 (1953).

³ H. KALK und E. WILDHIRT, Helv. med. Acta 19, H. 4/5 (1952).

⁴ D. KOCH-WESER, E. FARBER und H. POPPER, Arch. Path. 51, 498 (1951).

⁵ G. H. HIGGINS und R. M. ANDERSON, Arch. Path. 12, 186 (1931).

Tabelle I
Bromsulphaleinretention in mg%

A		B		
Normaltiere	CCl ₄ -geschädigt	CCl ₄ -geschädigt + Lebertotal-extrakt behandelt	Kontrollen (Hepatektomierte Tiere ohne Lebertotal-extrakt)	Behandelte (Hepatektomierte Tiere m. täglich 0,2 cm ³ Lebertotal-extrakt.
1,75	11,4	2,55	2,85	0,05
1,15	18,7	3,55	2,40	0,07
0,45	18,5	6,1	0,80	0,45
1,2	16,3	8,2	2,60	0,15
1,2	11,5	10,6	3,90	0,40
0,85		5,9	1,85	0,40
			5,80	0,30
			4,65	0,25
			6,15	0,30
			4,45	0,40
			5,20	0
			3,90	0
			6,10	0,30
			5,40	0,20
				0,35
1,1	15,28	6,15	3,87	0,24

des Lebergewebes entfernt wurden. Nach partieller Hepatektomie verfettet das übriggebliebene Lebergewebe sehr stark¹.

Wir haben die BS.-Probe an 29 Ratten 5 Tage nach der partiellen Hepatektomie durchgeführt; die Resultate sind aus Tabelle I B ersichtlich.

Die Werte der behandelten Tiere liegen bereits alle innerhalb des Normalbereiches (unter 2 mg %), während die der Kontrolltiere, bis auf 2, noch deutlich erhöht sind. Durchschnittswert 0,24 mit Streuungsbreite 0–0,45 gegenüber 3,87 (Streuungsbreite 0,8–6,15).

Aus diesen beiden Versuchen geht klar hervor, dass der Lebertotal-extrakt die Bromsulphaleinausscheidung an der akut mit CCl₄ vergifteten und an der partiell hepatektomierten Ratte fördert.

¹ R. EMMRICH und H. PETZOLD, Arch. Exp. Path. Pharmacol. 214, 333 (1952).

III. Prüfung der lipotropen Wirkung an Ratten nach partieller Hepatektomie. Mit den bei der Hepatektomie entnommenen Leberstückchen wurden Fettbestimmungen durchgeführt, um den Normalfettgehalt der Leber zu ermitteln. Der Totalfettgehalt¹ wurde gravimetrisch bestimmt und in % der Trockenleber ausgedrückt. Die Hälfte der hepatektomierten Tiere erhielt 0,5 cm³ Lebertotal-extrakt täglich. Nach 2 bzw. 5, bzw. 10 Tagen wurden die Tiere getötet und wieder, auf die gleiche Art, Fettbestimmungen des übriggebliebenen Lebergewebes ausgeführt.

Nach 2 Tagen ist die Verfettung besonders ausgeprägt. In dieser Gruppe tritt auch die lipotrope Wirkung des Lebertotal-extraktes am stärksten hervor: die Leber der Kontrolltiere enthalten über 30 % mehr Fett als die der behandelten Tiere (44,35 gegenüber 33,16 und 51,05 gegenüber 38,44). Nach 5 Tagen, zu einem Zeitpunkt, wo die Verfettung auch der Kontrolltiere bereits ziemlich abgenommen hat, ist die lipotrope Wirkung des Lebertotal-extraktes weniger auffallend, aber noch deutlich positiv (19,78 gegenüber 17,35 und 33,23 gegenüber 27,91). Nach 10 Tagen ist die Verfettung auch ohne Behandlung weitgehend verschwunden. Die viel stärkere Leberverfettung bei den weiblichen Tieren steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem Oestrogenstoffwechsel. Dahin deutende Beobachtungen wurden auch von SZEGO und ROBERTS² und von LONG und SIMMONS³ beschrieben.

Die Zahlen dieses dritten Versuches lassen den Schluss zu, dass der Lebertotal-extrakt die nach partieller Hepatektomie auftretende Verfettung des übriggebliebenen Lebergewebes hemmt und den nachfolgenden Fettransport beschleunigt.

IV. Das Verhalten der Albumine bei CCl₄-vergifteten Ratten mit und ohne Lebertotal-extrakt. Diese Untersuchungen wurden bei 5 Gruppen von Ratten wie folgt durchgeführt: die Tiere erhielten täglich 0,1 cm³ 10%iges CCl₄ in Arachisöl intraperitoneal 4 Wochen lang. Nach 4 Wochen wurden sie entblutet, zwecks Gewinnung von Serum zur papierelektrophoretischen Analyse. Eine zweite Gruppe der Versuchstiere erhielt

¹ D. KOCH-WESER, E. FARBER und H. POPPER, Arch. Path. 51, 498 (1951).

² C. M. SZEGO und S. ROBERTS, J. Biol. Chem. 178, 827 (1949).

³ R. S. LONG und E. E. SIMMONS, Arch. intern. Med. 88/6, 762 (1951).

Tabelle II
Leber-Fett-Bestimmung bei partieller Hepatektomie

Zahl der Tiere	Versuchsdauer	Geschlecht	Ko oder Behandelt	(1) % Fett am Tag der Hepatektomie	(2) % Fett bei der Tötung	Streuungsbreite	Differenz von (1) und (2)
16	2Tage	♂	Ko	14,82	44,35	38,70–48,60	+ 29,71
			B	14,15	33,16	30,30–37,45	+ 19,46
			Ko	15,28	51,05	46,60–55,40	+ 35,77
			B	15,82	38,94	33,56–44,30	+ 23,12
50	5Tage	♂	Ko	15,33	19,78	14,48–24,80	+ 4,45
			B	15,51	17,35	14,50–19,20	+ 1,84
			Ko	17,61	33,23	24,50–42,30	+ 15,62
			B	14,35	27,91	19,30–30,10	+ 13,66
12	10Tage	♂	Ko	15,26	16,81	—	+ 1,55
			B	15,00	16,78	—	+ 1,78
			Ko	16,51	22,76	—	+ 6,25
			B	15,14	21,24	—	+ 6,10

gleichzeitig 0,5 cm³ Lebertotalextrakt täglich intra-peritoneal. Bei 2 weiteren Versuchsgruppen wurde an die chronische CCl₄-Schädigung eine Erholung von 4 Wochen Dauer angeschlossen, worauf die Tiere entblutet und das gewonnene Serum papierelektrophoretisch untersucht wurde.

Tabelle III

Versuchsgruppen	Zahl d. Tiere	Mittelwert der Albumine in %	Streuungs-breite
1. Kontrolle (gesunde Tiere) . . .	9	48,3 ± 1,4	40,1–53,1
2.* Geschädigt mit CCl ₄ 10%, 0,1 cm ³ /100 KG täglich 4 Wochen lang	11	41,1 ± 0,9	36,8–47,1
3.* geschädigt + 0,5 cm ³ L täglich	10	45,5 ± 1,3	37,5–50,5
4. Geschädigt, anschlies-send 4 Wochen Erho-lung	8	46,1 ± 1,2	41,1–50,0
5. Geschädigt, aber ohne L	7	46,3 ± 1,3	41,3–49,5

Für die papierelektrophoretischen Untersuchungen der Sera sind wir dem Chemischen Laboratorium des Kantonsspitals Winterthur (Leiter: Dr. H. MÄRKI) sehr zu Dank verpflichtet.
* Die Albuminwerte der Gruppen 2 und 3 sind statistisch gesichert verschieden.

Es fällt zunächst auf, dass die Albuminwerte der Rattensera normalerweise eine sehr grosse Streuungs-breite aufweisen (Gruppe 1), welche Tatsache mit den Ergebnissen von SCHEIFFARTH und BERG¹ übereinstimmen. Ihr Mittelwert beträgt 48,3 ± 1,4% bei einer Streuungsbreite von 40,1 bis 53,1%. Der Mittelwert der Gruppe 2, der CCl₄-geschädigten Tiere, ist auf 41,1 ± 0,9% gesunken, wobei die Streuungsbreite der einzelnen Werte ebenfalls gross ist, die obere wie die tiefere Grenze derselben aber erheblich niedriger liegen (36,8 ± 47,1%). Demgegenüber lassen die gleichzeitig mit Lebertotal-extrakt behandelten Tiere (Gruppe 3) einen bedeutend geringeren Sturz der Albumine erkennen. Der Mittelwert aus 10 Versuchen beträgt 45,5 ± 1,3%. In den Ergeb-nissen der Gruppen 4 und 5 offenbart sich das Streben des Organismus nach einer Normalisierung der Albumin-werte. Zwischen diesen beiden Gruppen bestehen keine nennenswerten Unterschiede. Damit darf die schützende Wirkung von Lebertotalextrakt auf die Leber auch auf dem Sektor des Eiweißstoffwechsels als bewiesen gelten.
MARIANNE BURRI

Versuchsabteilung der Robapharm, Laboratoriums-AG., Basel, den 20. Juli 1953.

Summary

The good therapeutic results obtained in the treat-ment of chronic liver diseases with the protein-free liver-total-extract "Ripason" led us to investigate the action of the extract in rats with experimental liver injury. Sulfobromophthalein clearance, total liver lipids and blood-serum proteins were determined in CCl₄ poisoned and in partially hepatectomised rats. It was shown that the extract improved the liver function, that it had a lipotropic action and that the fall in the blood serum albumin resulting from liver injury could be prevented to a considerable degree.

1 F. SCHEIFFARTH und G. BERG, Z. ges. exp. Med. 119, 550 (1952).

DISPUTANDUM

Über das Wesen der optomotorischen Reaktionen (II)

Die Stellungnahme von W. v. BUDDENBROCK und INGRID MOLLER-RACKE¹ zu meinem ersten Aufsatz unter obigem Titel² veranlasst mich zu folgenden Bemerkungen.

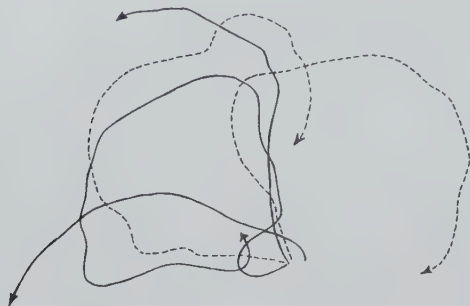
Wenn die Autoren bezüglich des Problems der Unter-scheidung aktiv und passiv bedingter Sinnesreizung darauf hinweisen, dass in vielen Fällen schon die Art des Reizes beweist (oder beweisen könnte), dass der eine Reiz aktiv, der andere passiv bedingt ist, und dass auch mein Bei-spiel der Seitenlinienreizung zu diesen Fällen gehört, so ist das gewiss richtig. Entscheidend aber ist, dass in anderen Fällen die aktiv und passiv bedingte Reizung völlig identisch ist und die Unterscheidung also sicher nicht ermöglicht. Auch davon habe ich ein Beispiel ge-geben (Einwirkung hydrostatischer Druckschwankungen auf die Elritze), wobei sich zeigte, dass das Tier die Reize dennoch genau unterschied. Weitere Beispiele bieten die optomotorischen Reaktionen. Ich möchte mich hier auf die drei Experimentalarbeiten aus der v. Buddenbrockschen Schule beschränken, die nach Ansicht meiner Opponenten Reaktionen auf aktiv er-zeuigte optische Reizung ergeben haben, während ich eine andere Deutung vorzog.

1. *Carcinus*. Bei Nachprüfung des Wolterschen Ver-suches sah ich, wie bereits in meiner ersten Mitteilung erwähnt wurde, deutliche optomotorische Augenstiel-bewegungen nur dann, wenn die Krabben an der Wand einer runden Schale entlang liefen, nicht dagegen beim Lauf entlang der geraden Wand eines Aquariums oder beim freien Lauf in der runden Schale (alles beim glei-chen, ruhenden Streifenmuster). v. BUDDENBROCK und MOLLER-RACKE haben nun beobachtet, dass Krabben auch bei freier, spontaner Drehung nach rechts die Augenstiele nach links bewegten und umgekehrt. Ich kann das auf Grund eigener Beobachtungen an Krabben und anderen Crustaceen durchaus bestätigen. Handelt es sich hierbei nachweislich um eine Reaktion auf retinale Bildverschiebung, so wäre damit zugleich ein Reagieren auf selbsterzeugte Reizung nachgewiesen. Einstweilen steht aber dieser Nachweis noch aus. Denn es ist denk-bar, dass die Krabbe gleichzeitig mit den motorischen Impulsen zu den Beinen, die etwa zu einer spontanen Rechtsdrehung führen, ebenso spontane Impulse zu den Augenstielen schickt, die diese in entsprechendem Aus-mass nach links drehen. Die Augenstielbewegung wäre somit ein spontaner Akt und nicht eine durch die Bild-verschiebung reflektorisch ausgelöste Reaktion. Ob und inwiefern das eine oder das andere zutrifft, können selbst-verständlich nur entsprechende Experimente lehren, deren Ergebnis abzuwarten ist. Es sei nur noch betont, dass dieses Ergebnis bloss die Augenstielbewegung bei freier, aktiver Drehung des Tieres betrifft; meine Deutung des Wolterschen Versuches bleibt davon insofern unbe-rührt, als ich die durch die runde Schalenwand indu-zierte Kreisbahn als vorwiegend passiv bedingt betrach-te, unter anderem auf Grund der Bewegungsweise der von mir beobachteten Tiere.

Theoretisch wenden v. BUDDENBROCK und MOLLER-RACKE gegen meine Auffassung ein: «Er unterscheidet

1 W. v. BUDDENBROCK und INGRID MOLLER-RACKE, Exper. 9, 191 (1953).
2 S. DIJKGRAAF, Exper. 9, 112 (1953).

jetzt wohlgemerkt nicht nur zwischen passiver und aktiver Bewegung, sondern zwei verschiedenen Arten von aktiver: solche, die ungehemmt verlaufen, und andere, bei denen die Bahn durch Umweltfaktoren irgendwie gesteuert wird.» Dieser Einwand ist unbegründet. Denn ich unterscheide beim intakten Tier ausschliesslich zwischen *passiver* und *aktiver* Bewegung. Jede aktive Bewegung wird durch Umweltfaktoren gesteuert, und zwar nicht «irgendwie», sondern indem diese Faktoren wiederum *passive* oder *aktive* Bewegungsänderungen bedingen.



Calandra oryzae, rechts geblendet, Lauf in ruhender Trommel: Trommel weiss; ——— Trommel vertikal gestreift (nach v. BUDDENBROCK und INGRID MOLLER-RACKE).

2. *Calandra*. Während v. BUDDENBROCK und MOLLER-RACKE die Bahn der rechts geblendeten *Calandra oryzae* früher¹ mit folgenden Worten beschrieben: «In der weissen Trommel läuft das Tier im Bogen nach rechts, in der schwarz-weiss gestreiften im Bogen nach links»², heisst es jetzt, «dass eine Krümmung der Bahn infolge der Einäugigkeit ja nur in der einfarbigen Trommel zu bemerken ist, aber nicht in der gestreiften»². In dieser läuft der Käfer, wie unsere hier nochmals wiedergegebene Abbildung zeigt, zunächst völlig ungestört geradeaus. Erst nach einiger Zeit wird das Tier durch eine unsichtbare Gewalt nach links herumgerissen. Wir hoffen damit auch für diesen zweiten Fall den Einwand DIJKGRAAFS widerlegt zu haben.» In Wirklichkeit zeigt die Abbildung der Kriechbahnen in der weissen und in der gestreiften Umgebung völlige, spiegelbildliche Symmetrie: auch in der weissen Umgebung läuft das Tier zuerst eine Strecke ungefähr geradeaus und biegt erst dann nach rechts. Diese weitgehende Symmetrie, sowohl im geraden als im gekrümmten Teil der Bahn, und die Tatsache, dass die Linkskrümmung in gestreifter Umgebung gerade in dem Moment einsetzt, wo in weisser Umgebung die Rechtskrümmung beginnen würde, entspricht ja genauestens meiner Deutung.

3. *Aeschnalarve*. Obwohl der Versuch mit der Libellenlarve nach Ansicht meiner Opponenten «einen besonders hohen Rang einnimmt», halten sie es im Hinblick auf das von ihnen anlässlich der Fälle *Carcinus* und *Calandra* Mitgeteilte «für überflüssig, nochmals auf dieses Problem einzugehen». Doch wäre gerade in diesem Falle eine Widerlegung meiner Auffassung am meisten angebracht gewesen. Denn während man bei *Carcinus* immerhin noch anführen könnte, die Passivität der Bahnkrümmung sei nicht strikt erwiesen, ist diese bei der am kreisenden Hebelarm geklebten Libellenlarve von vornherein gegeben. Meine Deutung scheint mir daher zwingend.

Versuche zur weiteren Klärung der hier diskutierten Fragen sind im Gange.

S. DIJKGRAAF

Institut für vergleichende Physiologie der Universität Utrecht, den 7. Juni 1953.

Summary

W. v. BUDDENBROCK and his collaborators claim to have demonstrated optomotor reactions due to the apparent displacement of the visual field caused by the animal's normal active movement. In two of the three cases mentioned (*Carcinus*, *Calandra*) the evidence brought forward is insufficient and needs further experimental investigation. In the third case (*Aeschna*) their conclusion is obviously erroneous: the sensory stimuli eliciting optomotor reactions are caused by the passive displacement (turning) inflicted upon the animal artificially and not by its active movement as such.

Schlussbemerkung:

Wir nehmen die neue Entgegnung von Herrn Professor DIJKGRAAF zur Kenntnis, möchten jedoch darauf verzichten, ihm an dieser Stelle nochmals zu antworten, da wir uns von einer rein theoretischen Erörterung dieser Probleme nichts versprechen. Wir verweisen auf unsere in Vorbereitung befindlichen neuen experimentellen Arbeiten.

W. v. BUDDENBROCK und
INGRID MOLLER-RACKE

COMPLEMENTUM

Über individuelle Bluteigenschaften¹

In dieser Zeitschrift¹ haben wir einen äusserst seltenen Antikörper beschrieben, der sämtliche Blutsorten agglutinierte, mit Ausnahme des eigenen Blutes. Wir haben das betreffende Blut Z(a-) genannt. Dr. R. RACE hat bereits die Vermutung geäussert, dass es sich vielleicht um die Eigenschaft Tj(a-) handelt. Bis jetzt wurden 2 solche Personen (zwei Schwestern) von PH. LEVINE in New York und ein Fall von Dr. ZUOTENDYK in Südafrika beschrieben.

Wir haben inzwischen unser Serum Herrn Dr. PH. LEVINE geschickt und von ihm sein Serum erhalten. Sowohl Dr. LEVINE wie wir konnten feststellen, dass es sich um eine identische Eigenschaft handelt. Aus Gründen der Priorität muss somit die von uns als Z(a-) beschriebene Eigenschaft Tj(a-) genannt werden. Es ist von grossem Interesse, dass in New York, Südafrika und in Polen identische, äusserst seltene Eigenschaften entstanden sind.

L. HIRSZFELD und MARIA GRABOWSKA

Mikrobiologisches Institut der Medizinischen Akademie, Wrocław (Breslau) Polen, den 1. April 1953.

¹ W. v. BUDDENBROCK und INGRID MOLLER-RACKE, Exper. 8, 392 (1952).

² Von mir hervorgehoben.

¹ L. HIRSZFELD und MARIA GRABOWSKA, Exper. 8, fasc. 9, 355 (1952).

PRO EXPERIMENTIS

Zum Verfahren der Radiographie unter Verwendung von Kollodiumemulsionen

Bei der in der ersten Mitteilung¹ beschriebenen Methode der Mikroautoradiographie mit Hilfe von Kollodiumemulsionen, die sich von den Gelatineemulsionen durch ihre bessere Verarbeitbarkeit und höhere Auflösung vorteilhaft unterscheiden, zeigte sich, besonders bei längeren Expositionszeiten, eine Trübung der photographischen Schicht, wenn man einen besser haftenden Zwischenguss aus einer Lösung von 3 g Rohkautschuk und 3 g Caedax in 90 cm³ Benzol verwendet. Um diese Trübungen zu vermeiden, wurde der Caedax-Kautschuk-Zwischenguss im staubfreien Trockenschrank bei 50°C einige Stunden getrocknet, dann in der Dunkelkammer mit der Kollodiumemulsion begossen und anschliessend in einer dicht schliessenden Aluminiumschachtel exponiert. Der Zwischenguss darf nicht zu dick sein, damit eine ausreichende Schärfe der Radiographie gewährleistet ist, andererseits muss man sich vor Porositäten hüten, da sonst das Gewebe des Schnittes einen reduzierenden Einfluss auf die Photoschicht ausüben kann, was zu Artefakten Veranlassung geben kann. Erst nach dem Entwickeln und Fixieren werden die noch feuchten Objekte gefärbt, durch eine Alkoholreihe möglichst schnell entwässert, kurz in Xylol gebadet und mit Cae-

dax eingeschlossen. Wird die Färbung vor Ausführung der Radiographie angewendet, so muss nach unseren Erfahrungen mit ganz erheblichen Einbussen an Radioaktivität gerechnet werden. Bei richtiger Behandlung sind die Objekte klar durchsichtig. Die Beobachtung wird dadurch erleichtert, dass die photographische Schicht etwas über dem Präparat liegt. Bei Arbeiten mit Radiokobalt empfiehlt sich die Organfixierung in Formolsublimat, die Einbettung in Paraffin¹. Der Verwendung von gebrauchtem Paraffin ist bei radioaktivem Arbeiten wegen der Verschleppungsgefahr der Aktivitäten unbedingt abzuraten. Die nach der Sublimatfixierung erforderliche Jod- und Thiosulfatbehandlung kann nach der Entwicklung der Färbung vorgenommen werden. Sie erwies sich als unschädlich für die entwickelte Photoschicht.

Die Ergebnisse von Arbeiten, die mit dieser Methode ausgeführt wurden, werden an anderer Stelle veröffentlicht. Die Arbeit wurde mit Unterstützung der deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

DIDA M. CLAUSEN und K. J. RASCH

Max-Planck-Institut für Chemie und Chemisches Institut der Universität Mainz, Abteilung für Tierphysiologie, Mainz, den 20. Juni 1953.

Summary

A modification of the automicroradiograph technique with collodion emulsions is given.

¹ J. Rasch, Exper. 9, 149 (1953).

¹ Besonders geeignet erwies sich für Einbettungszwecke das Paraffin 52/54 und 54/56 der Grube Messel, Messel bei Darmstadt.

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Gesammelte Mathematische Abhandlungen

VON LUDWIG SCHLÄFLI

Band II
381 Seiten
(Verlag Birkhäuser, Basel 1953)
(geb. Fr. 56.15)

Publié par les soins du Comité de rédaction de la Société helvétique des Sciences naturelles vient de paraître aux éditions Birkhäuser à Bâle le second volume des Œuvres complètes de SCHLÄFLI. Il contient les travaux que le grand géomètre bernois a consacrés de 1852 à 1867 à de profondes questions d'algèbre, d'analyse et de géométrie algébrique, notamment son mémoire sur la théorie des résultants d'un système d'équations algébriques, et ceux qui ont trait à la théorie des factorielles et à la théorie des surfaces. Le caractère algorithmique de ces travaux, leur richesse autant que leur généralité rappellent par certains côtés les Œuvres d'EULER et de CAYLEY, auxquelles se rattachent d'ailleurs plusieurs recherches de SCHLÄFLI. Des annotations et de nombreuses remarques font suite à ces mémoires et rendent plus attrayante encore la lecture de ce bel ouvrage.

A. AMMANN

Statistical Method in Biological Assay

By D. J. FINNEY

661 pages
(Charles Griffin & Co., London, 1952)
(68 s. or Swiss Fr. 49.50)

Bedeutung und Umfang dieses vorzüglichen Standardwerkes werden vielleicht am besten durch die vier «Studienpläne» illustriert, die der Autor dem Text voranstellt und in denen, je nach dem Interessengebiet des Lesers, ausgewählte Kapitel und Abschnitte zur ersten Lektüre empfohlen werden: (A) für Statistiker, (B) für Nichtmathematiker, (C) für Leser, die einen allgemeinen Überblick wünschen, (D) für Leser, die sich ausschliesslich für Bestimmungsmethoden mit qualitativem Wirkungskriterium interessieren. Infolge der natürlichen Variabilität der Versuchstiere ist das Resultat einer biologischen Bestimmung so gut wie wertlos, wenn nicht gleichzeitig ein Standardpräparat benutzt und die Fehlergrenzen bestimmt werden. Diese Einsicht wird glücklicherweise immer mehr Allgemeingut. Das vorliegende Buch bildet eine umfassende und exakte Darstellung der logischen Prinzipien und der mathematisch-statistischen Methoden, die der korrekten und möglichst wirtschaftlichen Anlage und Auswertung biologischer Bestimmungen zugrunde liegen sollen.

Der Verfasser bespricht zunächst kurz die seltenen *direkten Bestimmungen*, das heisst solche, in denen die Wirkungsstärke durch direkte Messung der Dosis ermittelt wird, die verabreicht werden muss, um eine bestimmte Wirkung hervorzurufen (Beispiel: Bestimmung der individuellen Lethaldosis Digitalis an Katzen). Von den 22 Kapiteln des Buches sind 14 *indirekten Bestimmungen mit quantitativem Wirkungskriterium* gewidmet, das heisst den zahlreichen Methoden, die auf der Auswertung von Dosis-Wirkung-Kurven für Standard und Testmaterial beruhen. Durch geeignete Transformierung der Masszahlen wird die Beziehung zwischen Dosis und Wirkung linear. Besteht lineare Abhängigkeit vom *Logarithmus* der Dosis, dann sind die Dosis-Wirkung-Geraden von Standard und Testmaterial parallel, ihr Abstand ist das Mass der Wirkungsstärke, und man hat es mit der grossen Klasse der «*parallel line assays*» zu tun (Beispiel: Uterusgewicht von Mäusen als Mass der Östrogenwirkung). Seltener sind «*slope ratio assays*», bei denen lineare Abhängigkeit von einer *Potenz* der Dosis besteht: Die Dosis-Wirkung-Geraden schneiden sich, und das Verhältnis ihrer Neigungen misst die Wirkungsstärke (Beispiel: Azidität von Milchsäurebakterien-Kulturen als Mass der Wirkung von Vitamin B₉). Für beide Klassen werden die geeigneten Versuchsanordnungen, die Methoden der Auswertung und die Voraussetzungen, von denen die Gültigkeit der Ergebnisse abhängt, eingehend besprochen. Fünf weitere Kapitel behandeln in ähnlicher Weise *Bestimmungen mit qualitativem Wirkungskriterium* (Beispiel: Bruchteil der getöteten Tiere als Mass der Wirkung von Insektengiften). Eine kurze Besprechung der Fragen, die bei Verwendung der *Zeit (Dauer) als Wirkungskriterium* auftreten, bildet den Abschluss (Beispiel: Latenzzeit nach dem Inokulieren als Mass für die Wirkung von Poliomyelitisvirus).

Das Buch ist nicht für Anfänger bestimmt. Weitgehende Vertrautheit mit den statistischen Methoden der Streuungs- und Kovarianzzerlegung und der Regressionsrechnung wird in den meisten Kapiteln vorausgesetzt. Auch die dem Nichtmathematiker empfohlenen Abschnitte sind vorwiegend im mathematischen Stil geschrieben; das erschwert bekanntlich manchem Biologen die Lektüre, und man kann sich fragen, ob dies ein Nachteil ist, der den unzweifelhaften Gewinn an Klarheit und Exaktheit aufwiegt. (Der Referent teilt in diesem Punkt völlig die auf S. 170 glänzend formulierte Meinung des Verfassers, die aus Platzmangel hier leider nicht zitiert werden kann.) Die eingehende Besprechung der Vorteile sowohl wie der Risiken, die mit der Benutzung rechnerisch einfacher Näherungsmethoden verbunden sind, dürfte dem Praktiker besonders wertvoll sein.

Es besteht kein Zweifel, dass diese erste gründliche und vollständige Darstellung des Gebietes eine bedeutende Bereicherung der biometrischen Literatur darstellt. Biologen und Statistiker werden die klaren Ausführungen des Werkes mit Nutzen zu Rate ziehen, und es wird unter anderem die sehr erwünschte Wirkung haben, ihre Zusammenarbeit zu fördern. R. BORTH

La synthèse protéique

Par EMILE F. TERROINE

539 pages

(Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1952)

Umfassende Kenntnisse der Literatur, ausgesprochene Fähigkeit zu klarer, eindrucklicher Darstellung und nicht zuletzt langjährige experimentelle Tätigkeit sind

Voraussetzungen, die der Autor des vorliegenden Buches unbestritten für sich beanspruchen darf. In Zusammenarbeit mit M^{lle} LEVY ist eine wertvolle Monographie über ein Wissensgebiet gelungen, das in den letzten Jahren vor allem durch die Entwicklung neuer Methoden (Ultrazentrifuge, Elektrophorese, Chromatographie und Isotopentechnik) eine sehr starke Erweiterung erfahren hat. «Construire des protéines est pour tout organisme une opération aussi nécessaire que continue», steht am Anfang des Buches, das sich in vier Hauptteile gliedert, beginnend mit der Bildung der Aminosäuren als grundlegende Voraussetzung. Ausführlich findet auch ihre Verwendung zu Entgiftungsreaktionen *in vivo* Erwähnung. In weiteren Abschnitten werden Eigenschaften der gebildeten Eiweisse, Eigenart, Bedingungen, Ort und Mechanismus der Synthese und schliesslich ausführlich Steuerung und Beeinflussung der Eiweissbildung durch Hormone und Vitamine behandelt. Das Buch gewinnt an Wert durch den ausführlichen und sorgfältigen Literaturnachweis mit mehr als 1800 Angaben, die alphabetisch angeordnet sind. Es ist in vielen Teilen von seltener Vollständigkeit und berücksichtigt auch die wertvollen älteren und früheren Arbeiten, lässt somit auch historische Zusammenhänge erkennen. Die sehr ausgeprägte Gliederung der grossen Kapitel in viele Einzelabschnitte trägt zur Übersichtlichkeit bei und erleichtert Lektüre und Nachschlagen. Auch in sprachlicher Hinsicht ganz ausgezeichnet geschrieben, kann TERROINEs Buch bestens empfohlen und als wertvolle Bereicherung in der Reihe wünschenswerter, nicht überdimensionierter Monographien bezeichnet werden. Unzulänglichkeiten dürfte es kaum aufweisen, mögliche Beanstandungen sind auf Details zu beschränken, wie auf die Schreibweise D₂ statt D für Deuterium. Wenig verständlich ist indessen die Feststellung, die Isotopensignierung hätte im Hinblick auf die Erforschung der synthetischen Fähigkeiten des Organismus wenig Neues, nicht schon Bekanntes gebracht. Zwischen früheren blossen Vermutungen und direkten Beweisen besteht ein grosser Unterschied. Der Nachweis des dynamischen Zustandes der Körperbausteine, insbesondere des Eiweisses und der Aminosäuren durch SCHÖNHEIMER, war wohl einer der grundlegendsten Beiträge zur Stoffwechselforschung. K. BERNHARD

Comparative Anatomy

An Introduction to the Vertebrates

By LEVERETT A. ADAMS and SAMUEL EDDY

520 pages with 364 figures

(John Wiley & Sons, Inc., New York, 1949)

(\$ 5.—)

Der 1. Hauptteil gibt nach einem kurzen Abschnitt über die Abstammungshypothesen der Wirbeltiere einen systematischen Überblick über die einzelnen Gruppen. Es folgt ein – leider viel zu fragmentarisches – Kapitel über die Embryologie. Im umfangreichen 2. Hauptteil werden die einzelnen Organsysteme vergleichend behandelt. Jeder Abschnitt enthält zunächst eine allgemeine Übersicht über das betreffende Organ, anschliessend wird dessen Bau bei den verschiedenen Gruppen besprochen, und zwar oft in ausserordentlich detaillierter Weise, so dass der Band auch als Nachschlagewerk benutzt werden kann. Die Beschreibung beschränkt sich allerdings auf das Grobmorphologische, die Histologie kommt kaum zur Sprache. Der Text wird durch zahl-

reiche Abbildungen wirksam unterstützt. Mit wenigen Ausnahmen handelt es sich um die Darstellung der tatsächlichen Verhältnisse einer bestimmten Tierart, nicht um Schemazeichnungen, was vor allem für die praktische Arbeit in Kursen ein Vorteil ist. Eine umfangreiche Liste gibt zum Abschluss kurze Erklärungen für die verwendeten Fachausdrücke.

Das Buch ist in erster Linie als Hilfsmittel für College-Wirbeltierkurse geschrieben, bietet also für diese Lernstufe des höhern Unterrichtes das Tatsachenmaterial. Die Schilderung ist zumeist eine einfache Aufzählung von Tatsachen; strittige Fragen werden etwa kurz erwähnt mit Pro und Kontra, doch ohne Stellung zu beziehen.

H. NÜESCH

Paul Ehrlich
Von HANS LOEWE
255 Seiten
(Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart, 1950)
(DM 9.50)

Von MARTHA MARQUARDT
229 Seiten
(Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1951)
(DM 15.–)

Die beiden Biographien unterscheiden sich dadurch, dass in der Darstellung von LOEWE (im Rahmen der Serie «Grosse Naturforscher») die wissenschaftliche Tätigkeit des Schöpfers der Chemotherapie – auch in den

Etappen vor der Aufnahme der chemotherapeutischen Arbeiten – eingehender gewürdigt wird als bei MARQUARDT. Auf Kosten dieser detaillierten Beschreibung der biologischen und chemischen Arbeiten EHRLICHS (mit Anführung sämtlicher Publikationen) wird in der Biographie von MARTHA MARQUARDT, die mit einer Einleitung von Sir HENRY S. DALE beginnt, die Lebensgeschichte von EHRLICH beschrieben. MARQUARDT war seine Sekretärin und als solche seine «rechte Hand». Aufmerksam hat sie das Leben ihres Chefs betrachtet, die zahlreichen beruflichen Korrespondenzen geführt, sie in Erinnerung behalten und jetzt auszugsweise wiedergegeben, so dass wir durch MARQUARDT einen Einblick in die Persönlichkeit von EHRLICH erhalten, die für denjenigen von besonderem Gewinn ist, welcher sich mit der Entwicklung und Lehre der Chemotherapie befasst. Ist doch das Wissen um fachliche und menschliche Eigenschaften immer dann wünschenswert, wenn es sich um Persönlichkeiten handelt, durch die unsere naturwissenschaftlichen Kenntnisse so bereichert werden und Impulse erfahren, dass ihre Auswirkung sich über Generationen hinaus bis in die jetzige Zeit geltend macht. Die momentanen und weiteren Entdeckungen von Chemotherapeutika bzw. Antibiotika sind ohne das Wirken von PAUL EHRLICH kaum vorstellbar. Dies ist mit der Grund, warum wir sowohl die Publikation von H. LOEWE wie die von M. MARQUARDT begrüßen. Das Studium der beiden Biographien gibt uns einen vollständigen Aufschluss über das persönliche, oft mit grossen äusseren Widrigkeiten verbundene Leben und über die Arbeitsmethoden einer in der naturforschenden Medizin seltenen Persönlichkeit, die in besonderer Weise produktives und kritisches Schaffen mit Güte vereinigt.

E. BERGER

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

THEORIA

Zur mathematischen Theorie der Gegenstromextraktion

Von H. HADWIGER, Bern¹

Die in technischen Betrieben und Laboratorien vielfach angewendeten Gegenstromextraktionsverfahren dienen zur Trennung chemischer Stoffgemische, wobei durch sinngemässe apparative Anordnung einzelne Trenneffekte vervielfacht werden.

Ein einfaches und leistungsfähiges Prinzip wurde von SIGNER² und seinen Mitarbeitern eingehend untersucht. Die Apparatur besteht aus einer Reihe von Extraktionskammern, welche sich (beispielsweise nebeneinander angeordnet) zu einer Extraktionskolonne vereinigen (vgl. die schematische Darstellung in Abb. 1).

Die Kolonne nimmt zwei nicht mischbare Lösungsmittel auf, wobei das spezifisch leichtere die oberen, das spezifisch schwerere die unteren Teile der Kammern ausfüllt. Die Kammern kommunizieren durch Bohrungen in den Trennwänden sowohl in den oberen als auch in ihren unteren Teilen.

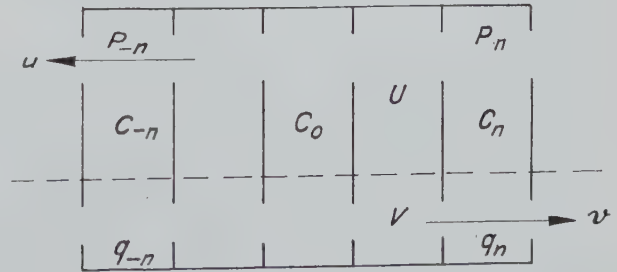


Abb. 1.

In der arbeitenden Kolonne fliesst in der oberen Phase ein gleichmässiger Strom von rechts nach links, in der unteren Phase ein solcher von links nach rechts. Das zu trennende Stoffgemisch wird in der mittleren Kammer in die obere Phase eingeleitet. Durch langsam rotierende

¹ Mathematisches Seminar und Institut für allgemeine und spezielle organische Chemie der Universität Bern.
² R. SIGNER, *Eine einfache Gegenstromextraktionsapparatur*, *Chimica* 6, 243 (1952).

kreisrunde Metallscheiben, welche in allen Kammern der Kolonne in beide Phasen eintauchen, wird die zur Einstellung des Konzentrationsgleichgewichts der sich lösenden Stoffe in beiden Phasen wirksame gemeinsame Trennfläche wesentlich vergrößert und beständig erneuert. Die beiden entgegengesetzt gerichteten Ströme transportieren die gelösten Stoffe beider Phasen kontinuierlich, und in jeder Kammer stellt sich das Konzentrationsgleichgewicht gemäss dem Nernstschen Gesetz sehr rasch ein. Oben links und unten rechts können Fraktionen abgenommen werden, die einen nach dem Multiplikationsprinzip verstärkten Trenneffekt aufweisen.

Derartige nach dem Signerschen Prinzip arbeitende Vielfach-Extraktoren wurden kürzlich von ALLEMANN¹ in theoretischer und vor allem experimenteller Beziehung einlässlich untersucht.

Weitere Studien über solche Apparaturen, insbesondere auch zur Frage der Prüfung und Messung ihrer Leistungsfähigkeit, rufen einer möglichst allgemein gehaltenen exakten mathematischen Erfassung der sich abwickelnden Vorgänge.

Die vorliegende, auf Anregung von SIGNER entstandene kleine mathematische Studie bezieht sich auf einen idealisierten Vielfach-Extraktor der oben skizzierten Art. Es werden die Formeln abgeleitet, welche die Konzentrationen einer Komponente des Gemisches in den beiden ausfliessenden Phasen als Funktion der Zeit darstellen, wenn der Zufluss in die mittlere Kammer eine beliebige vorgegebene Funktion der Zeit ist. Natürlich sind für die praktische Verwendung die zwei Hauptfälle der Momentaninjektion und der konstant gehaltenen Dauerinjektion von besonderer Bedeutung. Eine in allen Teilen streng durchgeführte Lösung des sich ergebenden mathematischen Problems scheint in dieser Allgemeinheit neu zu sein.

Vom mathematischen Gesichtspunkt aus dürfte die Herleitung der Lösung insofern einiges Interesse beanspruchen, als damit ein recht instruktives Beispiel für die praktische Anwendung der Abbildungsprinzipien der Analysis gegeben ist, wobei man die eigentliche Lösung des Problems im Bildbereich einer Funktionaltransformation – hier der Laplace-Transformation – vornimmt.

I.

Wir geben zunächst eine Übersicht über die gewählte Bezeichnungsweise in Verbindung mit einigen einfachen Beziehungen. Die Extraktionskolonne weise $2n + 1$ Kammern C_i ($i = -n, \dots, 0, \dots, n$) auf, welche, wie angedeutet, von links nach rechts von $-n$ bis n durchnummeriert sind. U und V sollen die Volumina des oberen (leichten Phase) und unteren (schweren Phase) Kammeranteils bezeichnen. Weiter sollen u und v die Ströme (Volumen je Zeiteinheit) oben (von rechts nach links) und unten (von links nach rechts) bedeuten, und w sei der in die mittlere Kammer C_0 einfliessende Injektionsstrom (Lösungsmittelvolumen je Zeiteinheit), der als mengenmässig klein – er dient nur zur Injektion des Stoffes – vernachlässigt werden soll. Es bezeichne $r = r(t)$ die Konzentration eines der zu trennenden Stoffe des Injektionsstromes als vorgegebene Funktion der Zeit t . Der Arbeitsbeginn der Kolonne fällt auf den Zeitpunkt $t = 0$. Weiter sollen $p_i = p_i(t)$ und $q_i = q_i(t)$ die Konzentrationen im oberen und unteren Teil der Kammer C_i bedeuten; es handelt sich um gesuchte Funktionen der Zeit t .

¹ K. ALLEMANN, *Über kontinuierliche vielstufige Gegenstromextraktion ohne Zerteilung der Phasen ineinander*, Diss. Bern (1953).

In jeder Kammer stellt sich augenblicklich das Konzentrationsgleichgewicht ein, so dass in jedem Zeitpunkt die Gleichgewichtsbedingung

$$q_i = k p_i \quad (1)$$

besteht, wobei k den Nernstschen Koeffizienten bedeutet.

Wir führen noch die folgenden Hilfszahlen ein:

$$a = \frac{u}{U + kV}; \quad b = \frac{kv}{U + kV}; \quad c = \sqrt{\frac{a}{b}}; \quad d = \frac{w}{U + kV}. \quad (2)$$

Die im Zeitpunkt $t = 0$ gültige Anfangsbedingung lautet offenbar

$$p_i(0) = q_i(0) = 0, \quad (3)$$

da bei Arbeitsbeginn sich nur reines Lösungsmittel in der Kolonne befindet.

II.

Das Problem, an dessen Lösung wir nun herantreten wollen, besteht darin, die Konzentrationen in den Kammern der Kolonne als Funktionen der Zeit zu ermitteln. In erster Linie interessieren die Konzentrationen in den oben links und unten rechts ausfliessenden Lösungen; dies sind die Konzentrationen in den Kammern C_{-n} oben und C_n unten. Mit geringfügiger Abkürzung bezeichnen wir sie mit $p = p(t)$ und $q = q(t)$, so dass also

$$p = p_{-n} \quad \text{und} \quad q = q_n \quad (4)$$

gesetzt wird.

Betrachten wir die sich in der Kammer C_i nach Ablauf der Zeit t angesammelte Stoffmenge, welche offenbar durch

$$Up_i + Vq_i \quad (5)$$

gegeben ist, so erhalten wir mit Berücksichtigung der mit den Phasenströmen zu- und abfliessenden Anteile die Darstellung

$$\int_0^t [u p_{i+1} - u p_i + v q_{i-1} - v q_i + \varepsilon_i w r] dt, \quad (6)$$

wobei wir mit zweckdienlicher Verabredung den Hilfskoeffizienten $\varepsilon_i = 1$ ($i = 0$), $\varepsilon_i = 0$ ($i \neq 0$) eingefügt haben, um den in die Kammer C_0 erfolgten Zustrom zu berücksichtigen.

Die Darstellung (6) gilt für alle $-n \leq i \leq n$, wenn wir noch die beiden verschwindenden Hilfsfunktionen

$$p_{n+1} = q_{-n-1} = 0 \quad (7)$$

künstlich hinzufügen, womit man dem Umstand Rechnung trägt, dass rechts oben und links unten nur reines Lösungsmittel in die Kolonne einströmt.

Werden die beiden Ausdrücke (5) und (6) einander gleichgesetzt und die q_i gemäss der Bindung (1) eliminiert, so ergibt die Ableitung nach t das Differentialgleichungssystem

$$p'_i = a p_{i+1} - (a + b) p_i + b p_{i-1} + \varepsilon_i d r, \quad (8)$$

wenn die Hilfszahlen (2) verwendet werden. Diese Relation gilt wieder für alle $-n \leq i \leq n$, wenn

$$p_{n+1} = p_{-n-1} = 0 \quad (9)$$

beachtet wird.

Nun setzen wir die Laplace-Transformation¹ ein, welche eine Funktion $f(t)$ gemäss der Integraltransformation

¹ G. DOETSCH, *Theorie und Anwendung der Laplace-Transformation* (Verlag Springer, Berlin 1937), insb. S. 21.

$$F(z) = L\left(f(t); z\right) = \int_0^{\infty} e^{-zt} f(t) dt \quad (10)$$

in eine Funktion $F(z)$ überführt. Mit dieser Symbolik setzen wir

$$L(p_i; z) = P_i; \quad L(p'_i; z) = z P_i; \quad L(r; z) = R. \quad (11)$$

Man beachte, dass bei der mittleren Formel für die Transformierte der Ableitung¹ die Anfangsbedingung (3) mitberücksichtigt ist.

Aus (8) resultiert nun

$$a P_{i+1} - (z + a + b) P_i + b P_{i-1} + \varepsilon_i d R = 0. \quad (12)$$

Mit Verwendung der in (2) eingeführten Konstanten c bilden wir jetzt eine Hilfsfunktion der zwei Veränderlichen z und ξ durch den Ansatz

$$H(z, \xi) = \sum_{-n}^{+n} P_i(z) c^i \xi^i. \quad (13)$$

Multiplizieren wir die Relation (12) mit $c^i \xi^i$, so ergibt die nachfolgende Addition über alle i von $-n$ bis n die Beziehung

$$\begin{aligned} \frac{1}{\xi} (H - P_{-n} c^{-n} \xi^{-n}) - \frac{z + a + b}{\sqrt{ab}} H + \\ + (H - P_n c^n \xi^n) + \frac{R d}{\sqrt{ab}} = 0, \end{aligned} \quad (14)$$

falls mitberücksichtigt wird, dass wegen (9) ja

$$P_{n+1} = P_{-n-1} = 0 \quad (15)$$

gelten muss. Die Gleichung (14) lässt sich nach H auflösen, und man erhält

$$H = \frac{P_{-n} c^{-n} \xi^{-n} + P_n c^n \xi^{n+2} - \frac{R d}{a} c \xi}{1 - 2 \frac{z + a + b}{2\sqrt{ab}} \xi + \xi^2} \quad (16)$$

Mit der Substitution

$$\cos \xi = x = \frac{z + a + b}{2\sqrt{ab}} \quad (17)$$

erhält man für den in (16) auftretenden gebrochenen Faktor die Reihenentwicklung

$$\frac{1}{1 - 2x\xi + \xi^2} = \frac{1}{\sqrt{1-x^2}} \sum_0^{\infty} U_{\nu+1}(x) \xi^{\nu}, \quad (18)$$

wo

$$U_n(x) = \sin n \xi \quad (19)$$

das n -te Tschebyscheffsche Polynom zweiter Art ist².

Der Reihenentwicklung (13) können wir jetzt die aus (16) und (18) entstehende Reihe für H gegenüberstellen; der Koeffizientenvergleich ergibt die Relation

$$\frac{1}{\sqrt{1-x^2}} \left(c^{-n} P_{-n} U_{n+i+1} - c^n P_n U_{i-n-1} - \frac{c d}{a} R U_i \right). \quad (20)$$

¹ G. DOETSCH, *Theorie und Anwendung der Laplace-Transformation* (Verlag Springer, Berlin 1937), insb. S. 152.

² W. MAGNUS und F. OBERHETTINGER, *Formeln und Sätze für die speziellen Funktionen der mathematischen Physik* (Verlag Springer, Berlin 1943), S. 78, 80.

Setzen wir hier $i = n + 1$ und beachten (15), so können wir nach P_{-n} auflösen, wobei wir noch berücksichtigen, dass $U_m = 0$ ist, falls $m \leq 0$ ausfällt. So ergibt sich

$$c^{-n} P_{-n} = \frac{d U_{n+1} R}{\sqrt{ab} U_{2n+2}}. \quad (21)$$

Setzen wir nun in (20) noch $i = n$, so kann P_n ermittelt werden, da auf der rechten Seite das mit (21) bereits gefundene P_{-n} substituiert werden kann. Es resultiert

$$c^n P_n = \frac{d (U_{n+1} U_{2n+1} - U_n U_{2n+2}) R}{\sqrt{ab} \sqrt{1-x^2} U_{2n+2}}. \quad (22)$$

Unter Berücksichtigung von (17) und (19) gewinnt man jetzt mittels einfacher goniometrischer Umformungen die Darstellung

$$c^n P_n(z) = c^{-n} P_{-n}(z) = \frac{d}{2\sqrt{ab}} R(z) K\left(\frac{z + a + b}{2\sqrt{ab}}\right), \quad (23)$$

wobei wir zur Abkürzung die Hilfsfunktion

$$K(x) = \frac{1}{T_{n+1}(x)} = \frac{1}{\cos(n+1)\xi}, \quad (24)$$

also das reziproke $(n+1)$ -te Tschebyscheffsche Polynom erster Art¹ eingeführt haben.

Müheles lässt sich nun die Partialbruchentwicklung des reziproken Polynoms (24) finden. Sie lautet

$$K(x) = \frac{1}{n+1} \sum_0^n (-1)^{\nu} \frac{\beta_{\nu}}{x - \alpha_{\nu}}, \quad (25)$$

wobei wir die Hilfswerte

$$\alpha_{\nu} = \cos \frac{(2\nu+1)\pi}{2n+2}; \quad \beta_{\nu} = \sin \frac{(2\nu+1)\pi}{2n+2} \quad (26)$$

verwendet haben. Man beachte hierbei, dass ja

$$T_{n+1}(x) = 2^n (x - \alpha_0)(x - \alpha_1) \dots (x - \alpha_n) \quad (27)$$

ist.

Die durch (25) dargestellte Funktion $K(x)$ ist die Laplace-Transformierte von

$$k(t) = \frac{1}{n+1} \sum_0^n (-1)^{\nu} \beta_{\nu} e^{\alpha_{\nu} t} \quad (28)$$

und die in (23) einzusetzende Funktion $K\left(\frac{z + a + b}{2\sqrt{ab}}\right)$ diejenige von

$$2\sqrt{ab} e^{-(a+b)t} k(2\sqrt{ab}t). \quad (29)$$

Die Laplace-Transformierte P_{-n} bzw. P_n ist nach (23), abgesehen von einem konstanten Faktor, das Produkt der Laplace-Transformierten R und K . Nach dem Faltungssatz² ist die entsprechende Funktion p_{-n} bzw. p_n durch ein Faltungsintegral der Funktionen r und k darstellbar. So gewinnt man

$$p_{-n}(t) = c^n d \int_0^t e^{-(a+b)\tau} k(2\sqrt{ab}\tau) r(t-\tau) d\tau \quad (30)$$

¹ W. MAGNUS und F. OBERHETTINGER, *Formeln und Sätze für die speziellen Funktionen der mathematischen Physik* (Verlag Springer Berlin 1943), S. 78, 80.

² G. DOETSCH, *Theorie und Anwendung der Laplace-Transformation* (Verlag Springer, Berlin 1937), insb. S. 168.

und

$$p_n(t) = c^{-n} d \int_0^t e^{-(a+b)\tau} k(2\sqrt{ab}\tau) r(t-\tau) d\tau. \quad (31)$$

III.

Auf Grund der letzten beiden Ergebnisse lässt sich die Lösung unseres Problems in der allgemeinsten Form finden. Es gelingt, die gesuchten Konzentrationen p und q mit Hilfe einer einzigen Hilfsfunktion h darzustellen, so dass h nur von der Kammerzahl abhängt, nicht aber von den durch Strömungs- und Volumverhältnisse und durch den Nernstschen Koeffizienten bedingten Hilfszahlen a , b , c und d .

Setzt man nämlich

$$h(t) = \frac{1}{n+1} \sum_0^n (-1)^v \beta_v e^{-(1-\alpha_v)t}, \quad (32)$$

wobei die Hilfswerte α_v und β_v mit (26) gegeben sind, so ergeben sich mit (30) und (31) die Darstellungen

$$p(t) = d \left(\sqrt{\frac{a}{b}} \right)^n \int_0^t e^{-(\sqrt{a}-\sqrt{b})^2 \tau} h(2\sqrt{ab}\tau) r(t-\tau) d\tau \quad (33)$$

und

$$q(t) = k d \left(\sqrt{\frac{b}{a}} \right)^n \int_0^t e^{-(\sqrt{a}-\sqrt{b})^2 \tau} h(2\sqrt{ab}\tau) r(t-\tau) d\tau. \quad (34)$$

In diesen Formeln sind zahlreiche sich auf besondere Verhältnisse beziehende und zum Teil in der chemischen Fachliteratur bereits entwickelte mathematische Gesetze als Spezialfälle enthalten.

Als einfachste und augenfälligste Folgerung ziehen wir aus den Darstellungsformeln den Schluss, dass die beiden Konzentrationen p und q in jedem Zeitpunkt und unabhängig vom zeitlichen Verlauf der Konzentration r des Zustroms ein festes Verhältnis bilden, indem die Beziehung

$$\frac{p}{q} = \frac{1}{k} \left(\frac{a}{b} \right)^n \quad (35)$$

in jedem Zeitpunkt gilt.

Hieraus folgt man noch, dass die in gleichen Zeiträumen ausfliessenden Stoffmengen ebenfalls ein stets gleichbleibendes Verhältnis bilden, welches durch

$$\frac{M_p}{M_q} = \left(\frac{a}{b} \right)^{n+1} \quad (36)$$

gegeben ist. In speziellen Fällen ist dieses Ergebnis bekannt.

IV.

Abschliessend betrachten wir noch den besonders wichtigen Spezialfall der Momentaninjektion. Bezeichnet M_0 die während eines sehr kurzen Zeitintervalls $0 \leq t < \Delta$ in die mittlere Kammer injizierte Stoffmenge, so dass mit einer sehr hohen Konzentration r die Beziehung

$$M_0 = w \int_0^\Delta r(t) dt \quad (37)$$

gilt, so erhalten wir aus (33) und (34) mit $\Delta \rightarrow 0$ die ein-

facheren Formeln¹

$$p(t) = d_0 \left(\sqrt{\frac{a}{b}} \right)^n e^{-(\sqrt{a}-\sqrt{b})^2 t} h(2\sqrt{ab}t) \quad (38)$$

und

$$q(t) = k d_0 \left(\sqrt{\frac{b}{a}} \right)^n e^{-(\sqrt{a}-\sqrt{b})^2 t} h(2\sqrt{ab}t), \quad (39)$$

wobei wir noch zur Abkürzung $d_0 = M_0 / U + kV$ gesetzt haben. Die nur von der Kammerzahl abhängige Hilfsfunktion ist mit (32) gegeben. Abbildung 2 zeigt ihren Verlauf für den Fall $n = 5$.

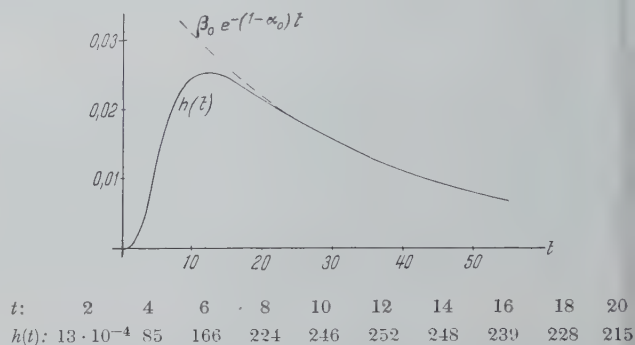


Abb. 2.

Erwähnenswert ist noch die weitere Spezialisierung, die sich im Sonderfall $k = 0$ ergibt. In diesem Fall dringt kein Stoff in die untere Phase der Kolonne ein, und die Wirkung des Gegenstroms wird vollständig aufgehoben. Die Kolonne arbeitet nur mit der oberen Phase, wobei jetzt nur $n+1$ Kammern wirksam sind. Aus (38) und (39) müssen sich durch Grenzübergang $b \rightarrow 0$ und $a \rightarrow u/U$, $d_0 \rightarrow M_0/U$ die sich auf diesen einfacheren Fall beziehenden bekannten Formeln ergeben. In der Tat ergibt sich

$$p(t) = d_0 \frac{(at)^n}{n!} e^{-at} \quad (40)$$

in Verbindung mit dem selbstverständlichen Resultat $q(t) = 0$.

Summary

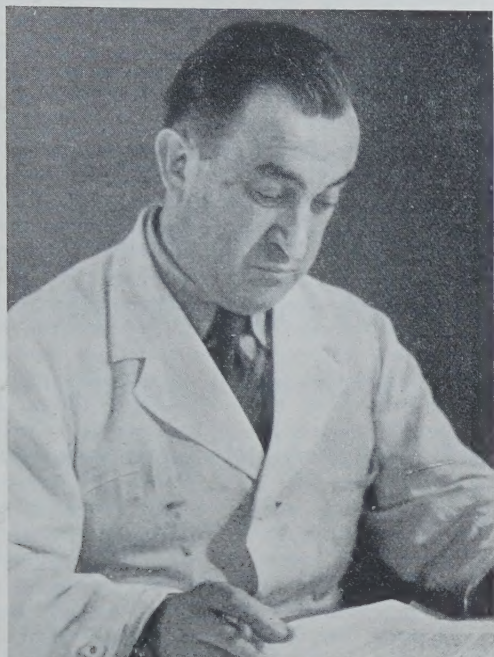
A mathematical theory is developed for an apparatus separating chemical mixtures, which has been studied by R. SIGNER and assistants in Berne. The method employed is one of extraction by the principle of counter-current in a series of coupled cells. The concentrations of the resulting fractions are given as functions of time, when the concentration of the solutions entering the middle cell of the apparatus is a known function of time.

¹ Diese sind identisch mit Formeln, welche von J. D. A. JOHNSEN und ALAN TALBOT (J. chem. Soc. 1743 [1950]) hergeleitet worden sind. Die genannten Autoren geben Formeln, welche insofern allgemeiner sind, als die Konzentrationen in allen Kammern berechnet werden und der Zufluss in einer willkürlich festgesetzten Kammer erfolgt.

IN MEMORIAM

Friedrich Hermann Rein

geboren 8. Februar 1898 in Mitwitz
gestorben 14. Mai 1953 in Göttingen



F. H. Rein

Als HERMANN REIN 1938 aus Zürich vom 15. Internationalen Physiologenkongress nach Göttingen zurückkehrte, erzählte er ein kleines Erlebnis von der den Kongress beschliessenden Fahrt auf das Jungfrauoch. Beim Abstieg vom Mönch sei ihm eine Seilschaft mit Studenten begegnet. Einer von diesen, ein Zuhörer seines vorjährigen Vortrages in Bern, habe ihn erkannt und ihn – des exponierten Standes und des Drängens der Hintermänner nicht achtend – mit der Frage überfallen: «Herr Professor, wie ist das nun eigentlich mit dem Adrenalin?» Solch physiologischer Wissensdurst auf dem Berggrat war etwas für REIN, und er mag nicht wenig Lust gehabt haben, auch an diesem Ort eine Diskussion über das angeschlagene Thema zu beginnen. War er doch jeden Augenblick bereit, physiologische Erkenntnisse zu sammeln oder weiterzugeben. Der steten Anwendung physiologischer Denkart auf das Alltagsleben entsprach seine Fähigkeit, aus allen Bereichen Nutzen für die Physiologie zu ziehen. «Das Laboratorium des Physiologen ist sozusagen die ganze Welt», schrieb er in einem Aufsatz, der die wachsende Bedeutung der Physiologie behandelte.

REINS Interessen galten von früh auf den Naturwissenschaften. Nach Abschluss der Schulzeit liess er sich im Winter 1916 in der naturwissenschaftlichen und medizinischen Fakultät der Universität Würzburg immatrikulieren. Bei Aufnahme der Studien war er noch unentschieden, ob er sich nicht ganz der Physik widmen solle. Die Begegnung mit seinem späteren, von ihm hochverehrten Lehrer MAX VON FREY, mag die Ent-

scheidung zur Medizin mitbestimmt haben. Mit dem Staatsexamen in München schloss REIN das Medizinstudium ab und kehrte nach Würzburg zurück. Am 1. Juni 1923 begann er dort seine wissenschaftliche Laufbahn als Rockefeller-Stipendiat am physiologischen Institut. Nicht ganz dreissig Jahre später wurde seiner vielseitigen und überaus fruchtbaren Tätigkeit auf der Höhe wissenschaftlicher Leistungskraft ein Ende bereitet.

HERMANN REIN war zum Experimentator berufen; er zog die Arbeit im Laboratorium jeder anderen wissenschaftlichen Betätigung vor. Seinen naturwissenschaftlich-medizinische Doppelbegabung verband sich mit ungewöhnlichem handwerklichem Geschick. Immer war er bestrebt, seine Versuchsanordnungen nicht nur selbst zu entwerfen, sondern auch in den Einzelheiten selbst herzustellen. Erfinderische Phantasie, zusammen mit einem sicheren Blick für die Anwendungsmöglichkeiten physikalisch-technischer Gegebenheiten, führten ihn bei jeder Fragestellung zu eigenwilligen methodischen Lösungen, die vielfach weitere Arbeitsrichtungen entscheidend bestimmt haben. Physiologie war für ihn in erster Linie Naturwissenschaft, in der Mass und Zahl herrschen und quantitatives Messen an die Stelle des qualitativen zu treten hat. Dabei auf das «nil delere» als obersten Grundsatz zu achten, war ihm eine Selbstverständlichkeit. Mehrfach erwähnt er A. VON HILLS Forderung, dass «die Anpassung der Instrumente an das Material als das Wesen physiologischer Forschung zu bezeichnen sei». Demselben Ziel einer adäquaten Messung der biologischen Funktion ohne deren Störung galt sein Bemühen, die Funktion niemals isoliert, sondern im Zusammenhang des ganzen Organismus zu untersuchen und zu verstehen.

Die ersten Arbeiten REINS schlossen sich an MAX VON FREYS sinnesphysiologische Untersuchungen an. Sie lassen bereits erkennen, mit welchem Gewinn er physikalisches Wissen auf die Erfordernisse physiologischer Forschung anzuwenden verstand und wie weit ihn andererseits die methodische Inangriffnahme des Problems über die engere Fragestellung hinaus zu allgemeineren Untersuchungen führte. Auf der Suche nach Möglichkeiten zur dosierbaren Vertaubung der Haut mittels elektroendosmotischer Einführung von Medikamenten gelangte er zur grundsätzlichen Klärung elektroosmotischer Erscheinungen im lebenden Gewebe, wodurch für die verschiedensten elektrobiologischen Untersuchungen späterer Zeit sowie für eine Reihe therapeutischer Anwendungen die Voraussetzungen geschaffen wurden. Auch nach seinem Übergang an das physiologische Institut in Freiburg i. Br. zu PAUL HOFFMANN beschäftigte er sich noch mit diesen Fragen; er behandelte sie 1926 abschliessend in seiner Habilitationsschrift, die in vier Veröffentlichungen über «Die Gleichstrom-Leiter-Eigenschaften und elektromotorischen Kräfte der menschlichen Haut...» niedergelegt wurde.

In der Folge wandte sich REIN regulationsphysiologischen Fragen zu. In gemeinsamen Versuchen mit SIGURD JANSSEN über die Durchblutung und Wärmebildung der Niere versuchte er, dem Gewebe zu kalorimetrischen Messungen bestimmte Wärmemengen mittels Diathermie zuzuführen. Die dabei auftretenden störenden Durchblutungsänderungen brachten ihn in glücklicher Kombination der Beobachtungen auf den Gedanken, aus der wechselnd starken Aufheizung des Blutstromes bei gleichmässiger Wärmezufuhr auf das jeweilige Stromzeitvolumen zu schliessen. Alle erforderlichen Massnahmen konnten dabei ohne Eröffnung der Blutgefässe und ohne Beeinträchtigung der physiologischen Bedingungen getroffen werden: Die Aufheizung des Blutstromes an einem Punkt durch Verwendung

hochfrequenter Ströme, die Messung der erzielten Erwärmung durch Thermoelemente vor und hinter der Heizstelle an der Gefässaußenseite. Die im Jahre 1926 betriebsfertige und vielfach erprobte Thermo-Stromuhr wurde auf den Kongressen der Deutschen Physiologischen und der Pharmakologischen Gesellschaft 1927 demonstriert. Sie ermöglichte es zum erstenmal, ohne Eröffnung der Gefässe die Durchblutung an mehreren Stellen des Organismus zugleich zu verfolgen. Ein wichtiger Schritt auf dem Wege zur quantitativen Erfassung physiologischer Grössen ohne Verletzung der natürlichen Bedingungen war getan.

Für REIN und seine Mitarbeiter eröffnete sich damit ein weites Arbeitsfeld, vorwiegend über Fragen der Kreislaufregulation. Die Anpassung des Kreislaufes an die Bedürfnisse des Gewebes und die unterschiedlichen Wirkungen der verschiedenen Steuersysteme gemäss dem jeweiligen Zustand der beteiligten Organe stand im Vordergrund des Interesses. Nur durch die fortlaufende Beobachtung der Durchblutungsverhältnisse an mehreren Stellen des Organismus zugleich wurde es möglich, ein klares Bild über die Interferenz verschiedener Vorgänge, etwa druck- und temperaturregulatorischer Art, sowie über die Abhängigkeit der Blutverteilungsregelung vom Gewebstoffwechsel zu gewinnen. Mit wachsender Deutlichkeit stellte sich ihm das Wechselspiel zwischen lokalchemischer Durchblutungsregelung und der zentralen Impulsen unterstellten Selbststeuerung des Kreislaufes dar; die «kollaterale Vasokonstriktion» ruhender Gewebspartien zugunsten tätiger wurde verständlich durch die Aufdeckung der gleichzeitig einsetzenden Stoffwechseleinschränkungen. In diesem Zusammenhang ergab sich die Notwendigkeit zur Überwachung des Gaswechsels. REIN ermöglichte sie 1932 – wiederum unter Ausnützung technischer Erfahrungen – durch Entwicklung des Gaswechselschreibers, mit dem Gasgemische fortlaufend registrierend analysiert werden können. Zahlreiche Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen Kreislauf und Atmung sowie über die Umstellung beider bei besonderen Beanspruchungen (Sauerstoffmangel) waren das Ergebnis der folgenden Jahre. In dieselbe Zeit fallen die ersten Veröffentlichungen zur Physiologie des Koronarkreislaufes, die 1939 mit entscheidenden Experimenten über den Herzstoffwechsel fortgesetzt wurden. Den Ausgangspunkt bildeten Überlegungen über die unphysiologisch niederen Werte des Nutzeffektes, wie sie am Herz-Lungen-Präparat gewöhnlich gefunden wurden. REIN vermutete, dass die Ursachen hierfür in der Isolierung des Organs zu suchen seien. Mit Hilfe entsprechender methodischer Vervollkommnungen der Anordnung gelang ihm der Nachweis, dass es im Zuge der Loslösung des Herzens aus dem Organismus – unabhängig von der Denervation – zu einer fortschreitenden Minderung des Nutzeffektes mit unverhältnismässig hohem Sauerstoffverbrauch kommt. Auf Grund früherer Beobachtungen über kreislaufdynamische Zusammenhänge zwischen Leber und Herz sowie über die Wirksamkeit bestimmter, den Gallensäuren verwandter Stoffgruppen zur Behebung von Herzinsuffizienzen sah er in der Leber das Organ, an dessen Mitwirkung die normale

Funktion des Herzens, wenigstens im Hinblick auf seinen Stoffwechsel, gebunden sei. An diese Hypothese schloss sich die letzte grosse Arbeitsperiode an, der die Konzeption des Milz-Leber-Mechanismus zu verdanken ist. Gestützt auf seine Experimente mit Haifischen an der zoologischen Station in Neapel wie auf vielfach modifizierte Warmblüterversuche entwickelte REIN seine Vorstellungen über die Wirksamkeit des Hypoxielinins, eines Wirkstoffes der Milz, der – nur über die Leber wirksam werdend – die Energiebereitstellung im Herzmuskel, insbesondere bei allgemeinem oder lokal im Herzen entstehendem Sauerstoffmangel, entscheidend beeinflusst.

HERMANN REIN war gleich erfolgreich als Forscher wie als Lehrer. Der frühen Habilitation folgte bereits nach drei Jahren die Ernennung zum Professor und Abteilungsleiter am Freiburger physiologischen Institut. Die hervorragenden Experimentielergebnisse machten REIN ebenso wie seine mit impulsiver Überzeugungskraft gehaltenen Vorträge schnell bekannt, so dass sich die Göttinger medizinische Fakultät 1931 entschloss, den noch nicht 34jährigen auf den Lehrstuhl für Physiologie zu berufen. Mit der Begeisterung des von seinem Fachgebiet Gefesselten widmete er sich dort dem physiologischen Unterricht. Seine Vorlesung, die er ständig durch neue Demonstrationen bereicherte, wurde ein mitreissendes Erlebnis für die Studenten; sie fand ihren Niederschlag in dem 1936 in 1., 1949 in 10. Auflage erschienenen Lehrbuch. Kurz vor Kriegsbeginn konnte REIN das neue, ganz nach seinen Plänen errichtete Institut beziehen. Er leitete es nach den Grundsätzen grösster Freiheit für den einzelnen. Nur wer selbst seinen Weg zu finden wusste, so wie auch er ihn ganz aus sich heraus gegangen war, eroberte sich einen Platz unter den Mitarbeitern. In 21 Jahren zog REIN 73 Schüler an sich, davon 25 aus 15 verschiedenen Staaten des Auslandes. Nur schweren Herzens trennte er sich im Herbst 1952 von seinem Institut und der Lehrtätigkeit, als ihn die Max-Planck-Gesellschaft zum Leiter des Institutes für Physiologie am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg berief. Nach aufopferungsvoller Tätigkeit im Dienste der Hochschule – von 1946 bis 1948 war er als Prorektor und Rektor der Göttinger Universität massgeblich am Wiederbeginn wissenschaftlichen Lebens in Deutschland beteiligt gewesen – glaubte er, mit der Beschränkung auf reine Forschungsarbeit seiner eigentlichen Bestimmung am besten gerecht zu werden. Es war ihm nicht vergönnt, die Arbeit in den eben eingerichteten Laboratorien aufzunehmen.

HERMANN REIN zählte zu den Grossen seines Faches. Er hatte einen hohen Begriff von der Verantwortung des Wissenschaftlers, den er sich ohne ein Gefühl der Verpflichtung zu Sauberkeit und Klarheit nicht denken konnte. Zu den Grundzügen seines Wesens gehörten Humanität und Friedensliebe. Er war überzeugt, dass gerade die Wissenschaft und ihre Vertreter dazu berufen seien, wahren und dauerhaftem Frieden den Weg zu bereiten. In der Achtung des Menschen vor dem Menschen sollte dieser Friede begründet sein; sie entsprang bei HERMANN REIN der Ehrfurcht vor allem Lebendigen.

J. ASCHOFF

Die Erforschung der Wirkstoffe des Mutterkorns beschäftigte namhafte Chemiker und Apotheker während Jahrzehnten. Einen ersten Markstein bedeutete die Entdeckung und Reindarstellung des Alkaloids Ergotamin in den Laboratorien der Sandoz A.G., wo in der Folge auch die Auffindung und Herstellung weiterer für die Medizin äusserst wertvoller Mutterkorn-Reinalkaloide gelang. Neue therapeutische Aspekte eröffnete die erstmals bei Sandoz erfolgte Hydrierung dieser Stoffe. Folgende Präparate sind das Ergebnis dieser Forschungen:

Cafergot

Dihydroergotamin-Sandoz

Gynergen

Hydergin

Methergin

Neo-Gynergen

Partergin



S A N D O Z A. G.

Eine Monographie über den Stand der Mutterkorn-Forschung steht Interessenten zur Verfügung.

Neuerscheinung

AUS DEM VERLAG BIRKHÄUSER · BASEL/STUTTGART

ARTHUR LINDER

Professor für mathematische Statistik an der Universität Genf
und an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich

Planen und Auswerten von Versuchen

Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure

(1953) 182 Seiten mit 9 Abbildungen und 21 Anwendungsbeispielen
In Ganzleinen Fr. 21.- (DM 21.-), broschiert Fr. 17.50 (DM 17.50)

GEKÜRZTES INHALTSVERZEICHNIS

0. Grundsätze für das Planen von Versuchen – 1. Versuche in Blöcken mit zufälliger Anordnung – 2. Versuche in lateinischen Quadraten – 3. Zwei Vergleichsreihen mit verschiedener Präzision in Teilparzellen – 4. Versuche mit mehreren Faktoren – 5. Versuche in unvollständigen Blöcken – 6. Mathematische Anmerkungen – 7. Literatur – 8. Tafeln – 9. Sachregister.

Neben der Erfahrung, dass die zahlenmässigen Erkenntnisse von Beobachtungen und Versuchen mit Hilfe mathematisch-statistischer Verfahren beurteilt werden müssen, hat sich in den letzten 30 Jahren eine weitere Erkenntnis durchgesetzt: *Der Plan des Versuches bestimmt die Ergiebigkeit und die Güte der Ergebnisse.* Dieses Werk gibt eine Einführung in dieses Gebiet, wobei das Schwergewicht auf die grundlegenden Gedankengänge und die einfacheren Versuchspläne gelegt wird.

VON PROF. DR. A. LINDER ERSCIEN AUSSERDEM:

Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure

238 Seiten mit 43 Fig. Zweite, erweiterte Auflage
Ganzleinen Fr. 31.20, broschiert Fr. 27.05 (1951).

ZU BEZIEHEN DURCH DEN BUCHHANDEL